



**Molekulare Charakterisierung der Interaktion
der Sensorkinase ETR1 aus *Arabidopsis thaliana*
mit nachgeschalteten Komponenten des
Ethylensignalwegs**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Benjamin Scharein

aus Remscheid

Düsseldorf, April 2012

aus dem Institut für Biochemische Pflanzenphysiologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Georg Groth

Korreferent: Prof. Dr. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung:

Aus den Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit sind zwei Veröffentlichungen hervorgegangen:

Dong C.H., Jang M., Scharein B., Malach A., Rivarola M., Liesch J., Groth G., Hwang I., Chang C. (2010) Molecular association of the Arabidopsis ETR1 ethylene receptor and a regulator of ethylene signaling, RTE1. *J Biol Chem.* 285(52): 40706-13.

Scharein B., Groth G. (2011) Phosphorylation alters the interaction of the Arabidopsis phosphotransfer protein AHP1 with its sensor kinase ETR1. *PLoS One.* 6(9): e24173.

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,

42

Douglas Adams

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|--------|---|----|
| I | Einleitung | 1 |
| I.1 | Pflanzliche Hormone | 1 |
| I.1.1 | Das Phytohormon Ethylen | 1 |
| I.1.2 | Die Geschichte der Ethylenforschung | 2 |
| I.2 | Die Signaltransduktion im Ethylensignalweg | 3 |
| I.2.1 | Die Ethylenrezeptoren und ihr Prototyp ETR1 | 3 |
| I.2.2 | Die Signalweiterleitung über CTR1 | 7 |
| I.2.3 | Die Signalweiterleitung über AHP1 | 8 |
| I.3 | Das Membranprotein RTE1 | 10 |
| I.4 | Fluoreszenzintensität und Fluoreszenzpolarisation als Methode zur Charakterisierung von biochemischen Eigenschaften | 11 |
| I.5 | Zielsetzung der Dissertation..... | 13 |
| II | Material und Methoden | 14 |
| II.1 | Material..... | 14 |
| II.1.1 | Geräte | 14 |
| II.1.2 | Chemikalien und Verbrauchsmaterialien..... | 15 |
| II.1.3 | Kommerzielle Kits..... | 16 |
| II.1.4 | Bakterienstämme | 16 |
| II.1.5 | Nährmedien zur Anzucht von <i>Escherichia coli</i> | 17 |
| II.1.6 | Enzyme und Antikörper | 18 |
| II.1.7 | Vektoren und rekombinante Plasmide | 18 |
| II.1.8 | Oligonukleotide | 21 |
| II.2 | Molekularbiologische Methoden..... | 22 |
| II.2.1 | DNA-Amplifikation und gerichtete Mutation mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR)..... | 22 |
| II.2.2 | Chromatographische Trennung von DNA-Fragmenten durch Agarosegelelektrophorese | 23 |
| II.2.3 | Isolierung von DNA aus Agarosegel | 24 |
| II.2.4 | Hydrolytische Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen | 24 |
| II.2.5 | Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase | 24 |

| | |
|--|----|
| II.2.6 Kontrolle der Vektor – Inset-Ligation mittels Polymerasekettenreaktion (Kolonie-PCR)..... | 25 |
| II.2.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> | 25 |
| II.3. Mikrobiologische Methoden | 26 |
| II.3.1 Herstellung von chemisch kompetenten <i>Escherichia coli</i> Zellen | 26 |
| II.3.2 Transformation von chemisch kompetenten <i>Escherichia coli</i> Zellen nach Hanahan (1983)..... | 26 |
| II.3.3 Überexpression von AHP1, AHP1-GFP ^{S65T} , AHP1 ^{H79A} -GFP ^{S65T} und AHP1 ^{H79E} -GFP ^{S65T} in BL21 Gold (DE3)-Zellen | 27 |
| II.3.4 Überexpression von ETR1-Protein in C43 (DE3)-Zellen..... | 27 |
| II.3.5 Überexpression von CTR1 in BL21 (DE3)pRARE-Zellen..... | 27 |
| II.3.6 Überexpression von RTE1 und RTE1 ^{C161Y} in BL21 Gold (DE3)-Zellen | 28 |
| II.3.7 Überexpression von ARR2 in BL21 Gold (DE3)-Zellen..... | 29 |
| II.3.8 Aufschluss von <i>Escherichia coli</i> Zellen | 29 |
| II.4 Proteinpräparation..... | 30 |
| II.4.1 Reinigung von AHP1 und AHP1-GFP ^{S65T} unter nativen Bedingungen durch immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) | 30 |
| II.4.2 Reinigung von ETR1 unter denaturierenden Bedingungen durch immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) | 31 |
| II.4.3 Reinigung von CTR1 unter nativen Bedingungen durch immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) | 32 |
| II.4.4 Reinigung von RTE1 und RTE1 ^{C161Y} unter nativen Bedingungen durch immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) | 33 |
| II.4.5 Reinigung von ARR2 unter nativen Bedingungen durch immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) | 34 |
| II.5. Proteinbiochemische Methoden | 35 |
| II.5.1 Umpuffern einer Proteinlösung mit einer Entsalzungssäule vom Typ PD10 | 35 |
| II.5.2 Konzentrieren einer Proteinlösung durch Ultrafiltration | 35 |
| II.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) | 36 |
| II.5.4 Silberfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen..... | 37 |
| II.5.5 Transfer und Immobilisierung von Proteinen auf einer Membran (<i>Western Blot</i>)..... | 38 |
| II.5.6 Immunologischer Nachweis von Oligo-Histidin-markierten Proteinen | 38 |
| II.5.7 Dansylierung von Proteinen..... | 39 |
| II.6 Spektroskopische Methoden | 40 |

| | | |
|---------|---|----|
| II.6.1 | Spektroskopische Konzentrationsbestimmung | 40 |
| II.6.2 | Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford..... | 41 |
| II.6.3 | Proteinkonzentrationsbestimmung durch Bicinchoninsäure | 41 |
| II.6.4 | Cirkulardichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) von Proteinen ... | 42 |
| II.7 | Methoden der Fluoreszenzintensität- und Fluoreszenzpolarisationsmessung. | 44 |
| II.7.1 | Bestimmung der Dissoziationskonstante durch Messung der Fluoreszenzpolarisation | 45 |
| II.7.2 | Bestimmung der Dissoziationskonstante durch Löschen der Tryptophanfluoreszenz (<i>Quenching</i>) | 47 |
| II.7.3 | Bestimmung des molekularen Gewichts durch den Perrin-Plot..... | 49 |
| II.8 | Radioaktive Methoden | 50 |
| II.8.1 | Nachweis der Kinaseaktivität von Proteinen mit γ - ³² P-ATP..... | 51 |
| III | Ergebnisse | 52 |
| III.1 | Quantifizierung der Interaktion zwischen ETR1 und RTE1 | 53 |
| III.1.1 | Denaturierende Reinigung von ETR1 durch IMAC | 53 |
| III.1.2 | Native Reinigung von RTE1 und RTE1 ^{C161Y} durch IMAC..... | 54 |
| III.1.3 | Strukturelle Untersuchung von RTE1 und RTE1 ^{C161Y} mittels CD- Spektroskopie | 55 |
| III.1.4 | Bestimmung der Dissoziationskonstante des ETR1 – RTE1- und ETR1 – RTE1 ^{C161Y} -Komplexes | 57 |
| III.2 | Charakterisierung und Quantifizierung der Interaktion zwischen ETR1 und AHP1 | 58 |
| III.2.1 | Native Reinigung von AHP1, AHP1-GFP ^{S65T} , AHP1 ^{H79A} -GFP ^{S65T} und AHP1 ^{H79E} -GFP ^{S65T} durch IMAC | 59 |
| III.2.2 | Untersuchung der Sekundärstruktur von AHP1 | 60 |
| III.2.3 | Bestimmung der Dissoziationskonstante des ETR1 – AHP1-GFP ^{S65T} Komplexes..... | 62 |
| III.2.4 | Bestimmung der Dissoziationskonstante des ETR1-AHP1 ^{H79A} -GFP ^{S65T} und ETR1-AHP1 ^{H79E} -GFP ^{S65T} Komplexes | 63 |
| III.2.5 | Wirkung von Agonisten auf die Komplexbildung von ETR1 und AHP1- GFP ^{S65T} | 64 |
| III.2.6 | Bestimmung der molekularen Größe von AHP1-GFP ^{S65T} | 67 |
| III.2.7 | Bestimmung der molekularen Masse des ETR1-AHP1 Komplexes..... | 68 |
| III.3 | Quantifizierung der Interaktion zwischen AHP1 und ARR2 | 70 |
| III.3.1 | Native Reinigung von ARR2 durch IMAC | 71 |

| | |
|--|-----|
| III.3.2 Strukturelle Untersuchung von ARR2 über CD Spektroskopie | 72 |
| III.3.3 Bestimmung der Dissoziationskonstante des AHP1-GFP ^{S65T} – ARR2 Komplex | 73 |
| III.4 Quantifizierung der Interaktion von ETR1 und CTR1..... | 75 |
| III.4.1 Native Reinigung von CTR1 Protein durch IMAC..... | 75 |
| III.4.2 Untersuchung der Sekundärstruktur von CTR1 | 76 |
| III.4.3 Nachweis der Kinaseaktivität von CTR1..... | 78 |
| III.4.4 Nachweis der Transkinaseaktivität von CTR1 | 79 |
| III.4.5 Bestimmung der Dissoziationskonstante des ETR1 – CTR1 Komplexes.... | 81 |
| III.5 Zusammenfassung der Ergebnisse | 83 |
| IV Diskussion..... | 85 |
| IV.1 Untersuchungen zu dem Membranprotein RTE1 | 86 |
| IV.1.1 Bestimmung der Bindungskonstante des ETR1-RTE1 Komplex..... | 86 |
| IV.2 Untersuchungen zum ETR1 – AHP1 Komplex..... | 89 |
| IV.2.1 Untersuchungen zu der Struktur von AHP1..... | 89 |
| IV.2.2 Untersuchungen zu der Interaktion von ETR1 und AHP1 | 90 |
| IV.2.3 Imitieren einer Phosphorylierung durch Substitution der Phosphorylierungsstelle durch Glutaminsäure | 92 |
| IV.2.4 Einfluss der Phosphorylierung auf die ETR1 – AHP1 Komplexbildung ... | 95 |
| IV.2.5 Analyse des ETR1 – AHP1 Komplex in Abhängigkeit von Ethylen Agonisten | 97 |
| IV.2.6 Bestimmung des Molekulargewichts von AHP1 und AHP1-GFP ^{S65T} | 98 |
| IV.2.7 Stöchiometrie des ETR1 – AHP1 Komplexes..... | 99 |
| IV.2.8 Untersuchungen zu dem Antwortregulator-Protein ARR2..... | 101 |
| IV.3 Untersuchungen zur MAP Kinase CTR1 | 103 |
| IV.3.1 Untersuchungen zu der Struktur von CTR1..... | 103 |
| IV.3.2 Untersuchungen zur Kinasaktivität von CTR1 | 104 |
| IV.3.3 Bestimmung der Bindungskonstante des ETR1 – CTR1 Komplexes | 105 |
| IV.4 Ein neues Modell für die ETR1 - AHP1 Signalübertragung | 106 |
| V Zusammenfassung..... | 109 |
| VI Abstract..... | 110 |
| VII Literaturverzeichnis..... | 111 |
| VIII Anhang | 126 |

| | | |
|----------|--------------------------|-----|
| VIII.1 | Sequenzen | 126 |
| VIII.2 | Sequenzvergleiche | 131 |
| VIII.3 | Plasmidkarten..... | 132 |
| VIII.3.1 | pET21a_AtAHP1..... | 132 |
| VIII.3.2 | pET21a_AtAHP1_sGFP | 132 |
| VIII.3.3 | pET21a_AtARR2 | 133 |
| VIII.3.4 | pET30a_AtCTR1..... | 133 |
| VIII.3.5 | pET16b_AtETR1 | 134 |
| VIII.3.6 | pET15a_AtRTE1 | 134 |
| IX | Abkürzungen..... | 135 |
| X | Danksagung..... | 138 |

I Einleitung

I.1 Pflanzliche Hormone

Pflanzen müssen sich auf viele biotische und abiotische Einflüsse einstellen können. Da Pflanzen in den meisten Fällen ortsgebunden sind, müssen sie sich an ihren Standort und die damit verbundenen Faktoren anpassen. Zu diesen Faktoren zählen beispielsweise Pathogene, Fressfeinde, zu hohe oder geringe Sonneneinstrahlung, Trockenheit und zu hohe Wassermengen (Abeles *et al.*, 1992). Um diese Einflüsse zu erkennen und darauf reagieren zu können, besitzen Pflanzen ein komplexes Netzwerk an Signaltransduktionswegen. Eine Anpassung an den Umweltreiz wird dabei durch die Bildung und Bindung von unterschiedlichen Phytohormonen an die dafür passenden Rezeptoren ausgelöst. Die für die Regulation verantwortlichen Hormone können in sieben Klassen unterteilt werden: Auxine, Cytokinine, Gibberelline, Abscisinsäure, Brassinosteroide, Jasmonsäure und das gasförmige Ethylen (Gray, 2004).

I.1.1 Das Phytohormon Ethylen

Das gasförmige Ethylen ist der einfachste ungesättigte Kohlenwasserstoff und zählt zu den Phytohormonen. Ethylen kontrolliert viele Prozesse im Pflanzenwachstum und der Entwicklung, wie zum Beispiel Apoptose, Abszission, Seneszenz, Blütenentwicklung, Knöllchenbildung, Fruchtreife und die Ausbildung des Apikalhakens bei Keimlingen (Abeles *et al.*, 1992, Mattoo & Suttle, 1991, Guzmán, 1990). Außerdem ist Ethylen an der Regulation der Reaktion auf biotischen Stress wie Pathogenbefall (Boller, 1991, Ecker & Davis, 1987) und abiotischen Stress wie Verwundung, mechanischer Perturbation, Trockenheit, Hitze, Kälte und Überflutung beteiligt (Yang & Hoffman, 1984, Abeles *et al.*, 1992, Jackson, 2002). Da Ethylen in

viele agrarökonomisch relevante Prozesse regulierend eingreift, wurde die Wirkung und Funktion des Pflanzenhormons Ethylen bereits in der Vergangenheit intensiv erforscht.

I.1.2 Die Geschichte der Ethylenforschung

Im Jahr 1864 beobachtete Girardin den „Einfluss von Leuchtgas auf die Promenaden- und Strassenbäume“. Er entdeckte, dass das austretende Gas von undichten Gasleitungen zur vollständigen Entlaubung der nahe stehenden Bäume führte. Dieser Effekt konnte 1901 von dem russischen Wissenschaftler Neljubov auf das Gas Ethylen zurückgeführt werden. Versuche mit etiolierten Erbsenkeimlingen zeigten eine typische Wachstumsveränderung, wenn sie mit Ethylen begast wurden. Dieser Effekt wird als *triple response* bezeichnet (Guzmán & Ecker, 1990). Die begasten Pflanzen zeigten in ihrem Phänotyp die drei charakteristische Merkmale; horizontales Wachstum, eine Verdickung des Hypokotyls und ein reduziertes Längenwachstum. (Guzmán & Ecker, 1990)

Der wohl bekannteste Effekt von Ethylen, die Förderung der Reifung, wurde schon vor über 100 Jahren beschrieben. Im Jahre 1910 entdeckte Cousins, dass Orangen ein Gas produzieren, welches Bananen schneller zum Reifen brachte. Weiterführende Versuche von Newton und Cook im Jahr 1927 zeigten, dass Ethylen hierfür verantwortlich war und die Reifung von klimakterischen Früchten förderte (Newton & Cook, 1927). Erst 1934 konnte Gane zeigen, dass Ethylen ein natürliches Pflanzenprodukt ist und von reifen und reifenden Äpfeln gebildet wird. Aufgrund der schwierigen Handhabbarkeit des Gases und der fehlenden Analytik, wurde die Biosynthese erst 35 Jahre später aufgeklärt.

Im Jahr 1979 wurde der Biosyntheseweg von Ethylen in Pflanzen durch Versuche mit radioaktiv markiertem ^{14}C - und ^{35}S -Methionin im Gewebe aus Äpfeln entschlüsselt (Adams & Yang, 1979). In der Ethylenbiosynthese wird Methionin über S-Adenosylmethionin zu 1-Aminocyclopropan-1-Carboxysäure (ACC) durch die ACC-Synthase umgesetzt. Durch das Enzym ACC-Oxidase wird aus der Vorstufe ACC direkt das Ethylen freigesetzt. Die Regulation der Aktivität der ACC-Oxidase kann durch Auxin induziert und durch Ethylen autoinduziert werden (Kende, 1993).

Die ACC-Oxidase wird konstitutiv in den meisten Geweben gebildet, die ACC-Synthase wird dagegen erst während der Fruchtreife induziert, womit ACC gebildet und zu Ethylen umgewandelt werden kann (Yang & Hoffman, 1984, Gray *et al.*, 1992). Ethylen wird dann von membrangebundenen Rezeptoren mit hoher Affinität gebunden und kann schon im nanomolaren Bereich physiologisch wirksam werden (Abeles *et al.*, 1992, Schaller & Bleecker, 1995).

I.2 Die Signaltransduktion im Ethylensignalweg

Durch Versuche mit Mutanten, die den *triple response*-Phänotyp zeigten, konnten viele molekulare Komponenten, die am Ethylensignalweg partizipieren, identifiziert werden. Der komplette Transduktionsweg ist bis heute jedoch nicht vollständig geklärt. So fehlen zu den bisher identifizierten Komponenten vor allem Informationen zu den molekularen Vorgängen bei der Signaltransduktion.

I.2.1 Die Ethylenrezeptoren und ihr Prototyp ETR1

Die Wahrnehmung und Signalweiterleitung von Ethylen wird von einer kleinen Familie von Membranproteinen vermittelt. In *A. thaliana* wurden die fünf Ethylenrezeptoren ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 und EIN4 in molekularbiologischen und

genetischen Studien identifizieren (Chang *et al.*, 1993, Sakai *et al.*, 1998, Hua *et al.*, 1995, Hua *et al.*, 1998). Diese können aufgrund ihres Aufbaus in zwei Unterfamilien eingeteilt werden. ETR1 und ERS1 gehören zur Unterfamilie I und besitzen drei Transmembranhelices. ETR2, ERS2 und EIN4 haben vier Transmembranhelices und gehören zur Unterfamilie II.

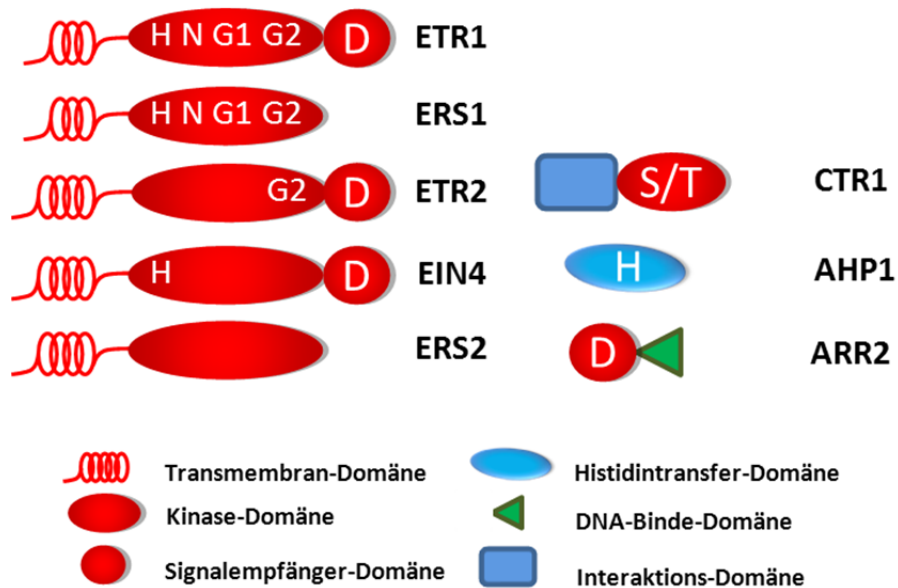


Abbildung I-1: Schematische Darstellung des Aufbau von Ethylenrezeptorproteinen und nachgeschalteten Komponenten aus *Arabidopsis thaliana*. In den Domänen sind die Motive N, G1- und G2-Box und die konservierten Aminosäuren Histidin, Aspartat und Serin/Threonin in abgekürzter Form dargestellt.

Der Aufbau der Rezeptoren, in Abbildung I-1 dargestellt, kann in drei Domänen eingeteilt werden, die hydrophobe Transmembran-Domäne, die Histidinkinase- und die Antwortregulator-Domäne. In der Histidinkinase-Domäne finden sich die Motive N, F, G1- und G2-Box und der für die Phosphorylgruppenübertragung wichtige konservierte Histidinrest. Diese Motive sind nicht in allen Rezeptoren vertreten. In der Antwortregulator-Domäne befindet sich ein konservierter Aspartatrest, der für die intra- und intermolekulare Phosphatübertragung wichtig ist. Die Antwortregulator-Domäne ist nur in den Rezeptoren ETR1, ETR2 und EIN4 vorhanden.

In den vier der fünf oben genannten Rezeptorproteinen sind ein Teil dieser Motive und Domänen enthalten. Nur ETR1 enthält alle Motive und die Empfängerdomäne, daher gilt ETR1 als Prototyp für die Ethylenrezeptoren in *Arabidopsis thaliana*. Aufgrund des Fehlens des konservierten Histidins in Kombination mit dem konservierten Aspartat in der Empfängerdomäne, ist die Funktion der Rezeptoren ERS1, ERS2 und ETR2 als Sensorhistidinkinasen für den Zwei-Komponenten-Weg unklar. Jedoch sind alle Rezeptoren im Ethylensignalweg aktiv (Hall *et al.*, 1999, Hua & Meyerowitz, 1998) und zeigen eine Autokinaseaktivität, wobei die Phosphorylgruppe bei fehlendem Histidinrest auf einen Serinrest übertragen wird (Moussatche & Klee, 2004).

Die Ethylenrezeptoren bilden *in vivo* und *in vitro* sowohl Homo- als auch Heterodimere aus (Schaller *et al.*, 1995, Gao *et al.*, 2008). In ETR1 wurden für die Dimerisierung die Aminosäurereste Cys 4 und Cys 6 im N-terminalen Bereich identifiziert (Grefen *et al.*, 2008, Hall *et al.*, 2000, Chen *et al.*, 2010). Durch die Dimerisierung bilden sich Rezeptorkomplexe, die Ethylen binden können. Für die Bindung von Ethylen konnte durch Mutagenesestudien ein Kupfer(I) Kation als Kofaktor identifiziert werden, welches in ETR1 an Cys 65 und His 69 koordiniert wird und welches für die Bindung von Ethylen als obligatorisch gilt (Rodríguez *et al.*, 1999, Bleecker *et al.*, 1998).

Für die Signalübertragung nach der Ethylenbindung am Rezeptor werden derzeit zwei mögliche Wege diskutiert. Diese sind in Abbildung I-2 dargestellt. Das Protein *ethylene resistant 1* (ETR1) steht als Ethylenrezeptorprototyp stellvertretend für die fünf bekannten Ethylenrezeptoren ETR1, ETR2, *ethylene response sensor 1* (ERS1), ERS2 und *ethylene insensitive 4* (EIN4), die im Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* identifiziert wurden. Das Signal kann von dem Rezeptorprotein ETR1 aus über das lösliche Protein *constitutive triple response 1* (CTR1) oder über die *Arabidopsis histidin-containing Phosphotransferproteine* (AHP) transduziert werden. Ausgehend von diesen

Proteinen kann das Signal über weitere Proteine in den Nucleus übertragen werden, um eine Signalantwort zu erzeugen. Die molekularen Prozesse der Signalweiterleitung sind bisher noch nicht geklärt und sind daher in der Abbildung I-2 mit grauen Pfeilen dargestellt.

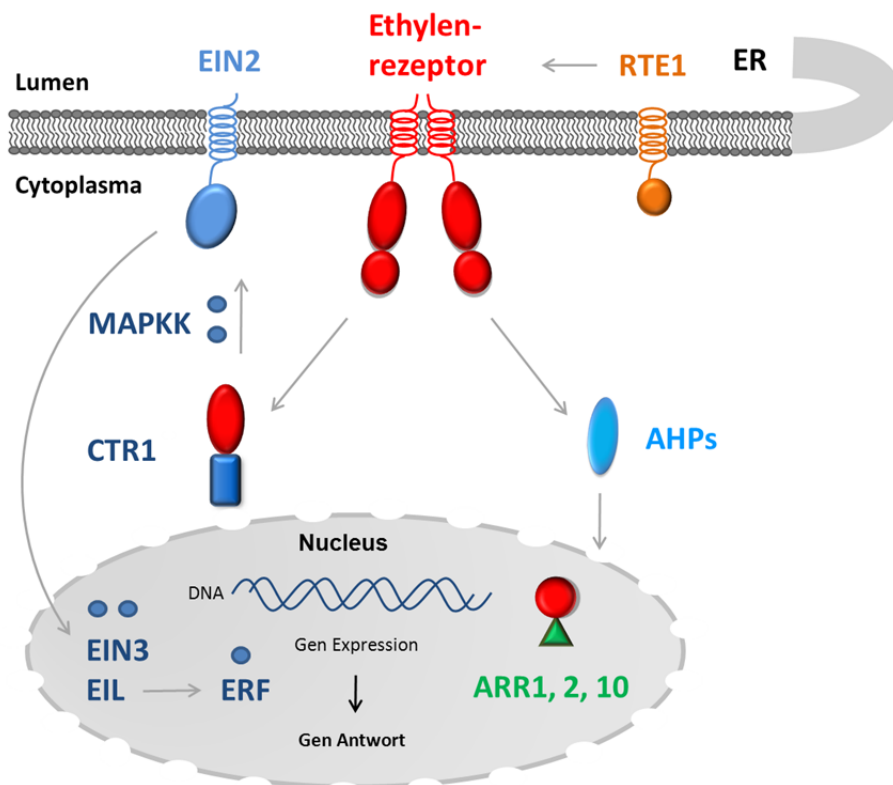


Abbildung I-2: Schematische Darstellung von aktuell diskutierten Modellen zur Signalweiterleitung im Ethylensignalweg. Die grauen Pfeile stellen bestätigte, aber biochemisch noch nicht charakterisierte Interaktionen dar. Das Membranprotein RTE1 wirkt regulierend auf den Ethylenrezeptor ETR1. Signale können von dem membranständigen Ethylenrezeptor (ETR1) über die löslichen Proteine AHPs auf ARRs in den Nucleus übertragen werden. Nach Ethylenbindung kann ETR1 nicht mehr hemmend auf CTR1 wirken, wodurch EIN2 über eine MAP Kinase Kaskade (MAPKK) aktiviert und ein Signal über EIN3, EIL und ERF in den Nucleus übertragen wird. ER = Endoplasmatisches Retikulum.

I.2.2 Die Signalweiterleitung über CTR1

CTR1 wurde als ein negativer Regulator im Ethylensignalweg identifiziert (Kieber *et al.*, 1993). CTR1 kann in zwei Domänen eingeteilt werden (vgl. Abbildung I-1), der N-Terminalen Interaktions-Domäne und der C-Terminalen Serin/Threonin-Kinase-Domäne. Über genetische Analysen wurde CTR1 als *rapidly growing fibrosarcoma* (RAF) Kinase-verwandtes Protein identifiziert, das als potentieller Interaktionspartner den Ethylenrezeptoren nachgeschaltet ist (Kieber *et al.*, 1993, Roman *et al.*, 1995, Sakai *et al.*, 1998). Über Hefe-Zwei-Hybrid Studien konnten ETR1 und ERS1 als Bindungspartner von CTR1 identifiziert werden. Die N-Terminale Domäne von CTR1 assoziiert sowohl mit der Histidinkinasedomäne von ERS1 und ETR1 als auch mit der Antwortregulator-Domäne von ETR1 (Clark *et al.*, 1998). Durch die Bindung von CTR1 an die Rezeptoren wird CTR1 inaktiviert (Huang *et al.*, 2003).

Für den dargestellten Weg in Abbildung I-2 wird das lösliche Protein CTR1 als Startpunkt einer *mitogen-activated protein* (MAP)-Kinase-Kaskade diskutiert. Wird CTR1 inaktiviert, kann ein Signal in Form einer Phosphorylierungskaskade das Protein *ethylene insensitive 2* (EIN2) aktivieren (Etheridge *et al.*, 2005). EIN2 kann die unter Kontrolle von Ubiquitin-Protein Ligasen (E3s) stehenden Transkriptionsfaktoren EIN3 und EIN3-like (EIL) phosphorylieren. Dieses Signal hat für EIN3 zwei entgegengesetzte Funktionen. Die Phosphorylierung von EIN3 wirkt stabilisierend wenn die Aminosäure Threonin 174 phosphoryliert wird, EIN3 wird jedoch abgebaut falls Threonin T592 phosphoryliert wird (Yoo *et al.*, 2008). Die Proteine EIN3 und EIL können nach ihrer Aktivierung das Protein *ethylene response factor* (ERF) aktivieren. Der Transkriptionsfaktor ERF initiiert daraufhin im Nucleus die Genexpression von Ethylen-Antwortgenen und startet so eine Signalantwort (Gagne *et al.*, 2004, Etheridge *et al.*, 2005).

I.2.3 Die Signalweiterleitung über AHP1

Aufgrund der Sequenzhomologie der Ethylenrezeptoren zu Histidinkinasen aus bakteriellen Zwei-Komponenten-Systemen, wird ein alternativer Weg zu CTR1 diskutiert. Die Signalweiterleitung mittels Phosphatübertragung von Sensorhistidinkinasen zu Antwortregulatorproteinen ist aus Bakterien bekannt, konnte aber auch in höheren Pflanzen nachgewiesen werden (Wurgler-Murphy & Saito, 1997).

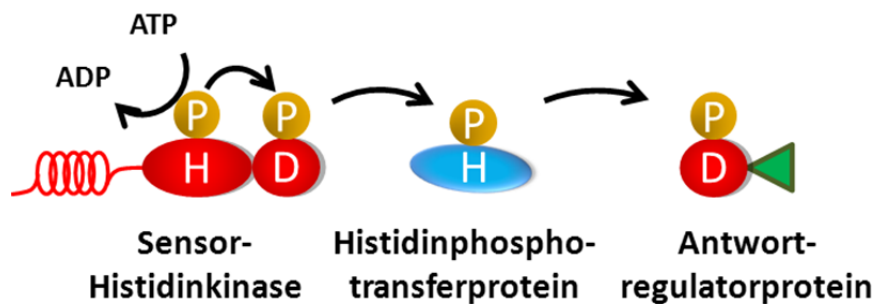


Abbildung I-3: Schematische Darstellung des Zwei-Komponenten-Systems in höheren Pflanzen. Die rote Helix stellt die hydrophobe Transmembrandomäne dar. In der Histidinkinasedomäne der Sensorhistidinkinase wird unter ATP Verbrauch ein Histidin autophosphoryliert (rotes Oval) und auf ein Aspartat in der Empfängerdomäne (roter Kreis) übertragen. Die Phosphorylgruppe wird über ein Histidinphosphotransferprotein (blaues Oval) auf die Empfängerdomänen des Antwortregulatorproteins transferiert, wodurch die DNA-Bindedomäne (grünes Dreieck) aktiviert wird.

Für die Signalweiterleitung durch das Zwei-Komponenten System in höheren Pflanzen wird unter ATP-Verbrauch ein konservierter Histidinrest in der Kinasedomäne einer Histidinkinase autophosphoryliert. Proteinintern wird die Phosphorylgruppe auf ein konserviertes Aspartat in der Signalempfänger-Domäne übertragen. Wie in Abbildung I-3 gezeigt, transportiert ein Histidinphosphotransferprotein die Phosphorylgruppe von dem konservierten Aspartat der Empfänger-Domäne der Sensorkinase auf ein konserviertes Aspartat in der Empfänger-Domäne des Antwort-Regulator-Proteins (*Arabidopsis response regulator*, ARR), welches im Nucleus lokalisiert ist. Durch die Phosphorylierung wird

das Antwort-Regulator-Protein aktiviert und kann, im Fall von ARR2, als Transkriptionsfaktor wirken (Hass *et al.*, 2004).

Im alternativen Weg in Abbildung I-2 wird das Signal von ETR1 auf eines der löslichen Phosphotransferproteine (AHPs) übertragen. Für eine Phosphatübertragung in *Arabidopsis thaliana* konnten die Phosphotransferproteine AHP1 bis AHP6 identifiziert werden (Mizuno *et al.*, 1999, Theologis *et al.*, 2000). Für die Proteine AHP1 bis AHP3 wurde über Hefe-Zwei-Hybrid Analysen die Interaktion mit der membranextrinsischen Domäne von ETR1 (Aminosäuren 321-721) nachgewiesen (Urao *et al.*, 2000). Sie könnten das Signal in Form einer Phosphorylgruppe aufnehmen und in den Nucleus weiterleiten.

In Hefe-Zwei-Hybrid Versuchen konnten die Transkriptionsfaktoren ARR1, ARR2 und ARR10 als direkte Interaktionspartner von AHPs identifiziert werden (Urao *et al.*, 2000, Suzuki *et al.*, 2001). Durch Expressionsanalysen von RNA aus Pflanzen, die ARR2 oder die Mutante D80E exprimierten, konnte gezeigt werden, dass ARR2 das komplette Zwei-Komponenten-Signal Netzwerk beeinflusst (Hass *et al.*, 2004). Weiterhin konnte für ARR2 eine Funktion in der Regulation der Genexpression von *pathogenesis-related protein 1* (Pr1) einem Markierungsgen für die Pflanzenimmunität gezeigt werden (Choi *et al.*, 2010). Durch Funktionsverlustmutanten von ARR2 konnte außerdem ein Ethylen-insensitiver Phänotyp erzeugt werden, was auf eine bedeutende Rolle von ARR2 im Ethylensignalweg hindeutet (Hass *et al.*, 2004).

I.3 Das Membranprotein RTE1

Das Membranprotein *REVERSION-TO-ETHYLENE SENSITIVITY* (RTE1) wurde erstmals 2006 von Resnick *et al.* in einer genetischen Studie zur Unterdrückung von ETR1-2 Mutanten entdeckt. Es kommt hoch-konserviert in Pflanzen und Protisten vor, nicht aber in Pilzen und Prokaryoten (Resnick *et al.*, 2006). In genetischen Studien konnte RTE1 als ein negativer Regulator der Ethylenantwort identifiziert werden. RTE1 reguliert die Funktion von ETR1, indem die Sensitivität von ETR1 für Ethylen reduziert wird. In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass Ethylen die RTE1-Expression induziert. Die Überexpression von RTE1 führt zu reduzierter Ethylensensibilität, während es in RTE1-ETR1-*Knockout*-Mutanten in *A. thaliana* zu einer verstärkten Ethylenantwort kommt. Während der N-Terminus von ETR1 wichtig für die Regulation durch RTE1 ist, ist der N-terminale Bereich von RTE1 nicht notwendig für die regulatorische Funktion von RTE1 auf ETR1 (Zhou *et al.*, 2007). Sowohl ETR1 als auch RTE1 sind im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert (Dong *et al.*, 2008).

I.4 Fluoreszenzintensität und Fluoreszenzpolarisation als Methode zur Charakterisierung von biochemischen Eigenschaften

Bei der Fluoreszenz handelt es sich um eine Absorption von elektromagnetischen Wellen und darauf folgend die Emission einer elektromagnetischen Welle mit niedrigerer Frequenz bzw. höherer Wellenlänge. Für nicht viskose Lösungen gilt, dass die beweglichen Fluorophore sich beliebig verteilen und sich in ihrer Position verändern können. Wird die Lösung nun durch linear polarisiertes Licht angestrahlt, können nur solche Fluorophore angeregt werden, deren Anregungsdipol parallel zu der Polarisationssebene liegt. In der Zeit zwischen Anregung des Fluorophors und der Emission rotieren die Moleküle und somit erfolgt die Emission der Fluoreszenz ungeordnet, das heißt in eine andere Richtung als die Anregungsrichtung.

Typische Fluoreszenzlebenszeiten liegen zwischen 10^{-9} bis 10^{-8} Sekunden. In dieser Zeit kann sich ein Molekül in seiner Ausrichtung durch Brown'sche Molekularbewegung drehen. Für Moleküle mit einem geringen Molekulargewicht, wie einzelne Fluorophore, liegt die Rotationskorrelationszeit, also die Zeit für eine Änderung des Emissionsdipols, bei nur 5 bis 10×10^{-11} s. Liegen die Fluoreszenzlebenszeit und die Rotationskorrelationszeit in derselben Größenordnung, kann über die Beweglichkeit des Moleküls eine Komplexbildung durch die Größenzunahme und die damit verbundene Erhöhung der Korrelationszeit ermittelt werden.

Neben der Bestimmung von Bindungskonstanten ist es möglich, durch Änderung der Temperatur oder der Viskosität, das molekulare Gewicht und somit das stöchiometrische Verhältnis von Proteinen zu bestimmen.

Für die Messung von Protein-Protein Interaktionen eignen sich nicht nur Fluoreszenzfarbstoffe, sondern auch das gut untersuchte autofluoreszierende *green*

fluorescent protein (GFP) als Fluorophor (Park & Raines, 1997). Die Nutzung eines Proteinhybrids, bestehend aus einem GFP als Fluoreszenzmarker und dem zu untersuchenden Zielproteins selbst, bietet sowohl den Vorteil einer direkten Einsetzbarkeit für Messungen der Fluoreszenzpolarisation als auch eine hohe Sensitivität, wodurch nur geringe Proteinmengen benötigt werden. Durch Mutationen im GFP konnten viele Eigenschaften optimiert werden. Durch die Mutation S65T konnte die Helligkeit erhöht und die Fluorophorbildung beschleunigt werden, während gleichzeitig ein langsames Ausbleichen erreicht wurde. Durch Verwendung dieser GFP-Variante kann die benötigte Menge an Protein in Fluoreszenzmessungen verringert und die Messdauer deutlich verlängert werden (Heim *et al.*, 1995).

I.5 Zielsetzung der Dissertation

Zu Beginn dieser Arbeit lagen nur wenige Informationen aus genetischen und Hefe-Zwei-Hybrid Studien vor, die die Bindung zwischen dem Prototyp der Ethylenrezeptoren ETR1, dem Membranprotein RTE1, der MAPKK-Kinase CTR1 und dem Phosphotransferprotein AHP1 aus *Arabidopsis thaliana* beschreiben.

Ziel dieser Dissertation war die biochemische Charakterisierung des Zusammenspiels der Komponenten der Signalkaskade der Ethylenwahrnehmung in *A. thaliana* mittels fluoreszenzspektroskopischen Methoden *in vitro*.

Da die bisher durchgeführten genetischen Methoden nicht geeignet sind, die Komplexbildung quantitativ zu erfassen, sollten in dieser Arbeit die an der Ethylensignalweiterleitung beteiligten Rezeptorkomplexe mit Hilfe von fluoreszenzspektroskopischen Messungen eingehend charakterisiert werden. Dabei sollten Komplexstabilität, Affinität der Bindungspartner sowie die Stöchiometrie der Rezeptorkomplexe quantitativ untersucht werden und Rückschlüsse auf die Bedeutung der einzelnen Komplexe für die Ethylensignaltransduktion gezogen werden.

Weiterhin sollte sowohl der Einfluss des Phosphorylierungsstatus der Proteine als auch der Einfluss des Pflanzenhormons Ethylen auf die Interaktion des Ethylenrezeptorkomplex mit seinen nachgeschalteten Bindungspartnern untersucht werden.

II Material und Methoden

II.1 Material

II.1.1 Geräte

Für die Anfertigung dieser Dissertation wurden neben der üblichen Laborausstattung folgende Geräte verwendet:

| | |
|--|---|
| Optima-L80 XP Ultrazentrifuge Rotoren Ti70.1, SW-55 | Beckman Coulter, Krefeld |
| Avanti J-26 XP Standkühlzentrifuge Rotoren JA-10, JA-25.50 | Beckman Coulter, Krefeld |
| Eppendorf 5810R Kühlzentrifuge Rotoren F-34-6-38, A-4-44 | Eppendorf, Hamburg |
| 40K French Press Aufschlusszelle French Pressure Cell Press | Heinemann, Schwäbisch Gmünd Heinemann, Schwäbisch Gmünd |
| Ultraschalldesintegrator Branson-Sonifier ÄKTA Prime | Heinemann, Schwäbisch Gmünd GE Healthcare, Uppsala, Schweden |
| DU800 Spektralphotometer | Beckman Coulter, Krefeld |
| LS-55 Fluoreszenzspektrometer mit FFA | Perkin Elmer Inst., Rodgau-Jügesheim |
| Peltierelement mit sekundärer Rückkühlung | Perkin Elmer Inst., Rodgau-Jügesheim |
| Semi-Halbmikro Quarz-Küvette | Perkin Elmer Inst., Rodgau-Jügesheim |
| FLA 3000 Fluorescent Image Analyzer | Fuji Film Europe, Düsseldorf |
| LAS 1000 Luminescent Image Analyzer | Fuji Film Europe, Düsseldorf |
| Gelsystem für Polyacrylamidgele | Zentralwerkstatt, der HHU, Düsseldorf |
| Mighty-Small II Gelsystem | Hoefer Scientific Instruments, Kalifornien, USA |

| | |
|--------------------------------------|-----------------------|
| Milli-Q-gradient Wasserfilteranlage | Millipore, Schwalbach |
| PerfectBlue Semi-Dry Elektrobloetter | Peqlab, Schwalbach |

II.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

| | |
|---|---|
| Amicon Ultrafiltratoren (10, 30 & 50 kDa MWCO) | Millipore, Schwalbach |
| Ni-NTA | Qiagen, Hilden |
| Ni-IDA, Protino | Macherey-Nagel, Düren |
| HisTrap HP Säulen | GE Healthcare, München |
| PD10 Sephadex G-25 Säulen | GE Healthcare, München |
| n-Dodecyl- β -D-Maltopyranosid | Glycon, Luckenwalde |
| 1-Dimethylaminonaphthalin-5-sulfonylchlorid (Dansylchlorid) | AppliChem, Darmstadt |
| γ - ³² P-ATP (3000 μ Ci/mmol) | Hartmann Analytic, Braunschweig |
| 1kb DNA Ladder | NEB, Frankfurt am Main |
| Precision Plus Protein Dual Color Standard | Bio-Rad, München |
| PageRuler Plus Prestained Protein Ladder | Thermo Scientific/ Fermentas, St. Leon-Rot |
| Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder | Thermo Scientific/Fermentas, St. Leon-Rot |
| Myelin Basischen Protein aus Rindern (M1891) | Sigma-Aldrich, München |

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, in Analysequalität (p.a.) von den folgenden Firmen bezogen: Sigma-Aldrich (München), Carl Roth (Karlsruhe), Becton Dickinson (Heidelberg), J.T. Baker (Deventer NL) und Merck (Darmstadt).

Die in dieser Arbeit verwendeten Lösungen, Puffer und Medien wurden mit sterilem Reinstwasser aus einer Millipore Milli-Q-Gradient Wasserfilteranlage angesetzt.

II.1.3 Kommerzielle Kits

| | |
|--|------------------------------------|
| QIAprep Spin miniprep Kit | Qiagen, Hilden |
| QIAquick Gel Extraction Kit | Qiagen, Hilden |
| Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate | Millipore, Schwalbach |
| Bio-Rad Protein Assay | Bio-Rad, München |
| BCA-Reagenz | Thermo Scientific/Pierce, Schwerte |

II.1.4 Bakterienstämme

Tabelle II-1: Verwendete *E. coli*-Stämme

| Stamm | Genotyp | Bezugsquelle |
|-----------------|---|------------------------------------|
| XL1 blue | <i>E. coli</i> recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F ⁻ proAB lacI ^q ZΔM15 Tn10 (Tet ^r)] | Stratagene, La Jolla USA |
| BL21 (DE3) | <i>E. coli</i> B F ⁻ dcm ompT hsdS(_{r_B⁻ m_B⁻) gal} | Stratagene, La Jolla USA |
| BL21 Gold (DE3) | <i>E. coli</i> B F ⁻ ompT hsdS (_{r_B⁻ m_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal λ(DE3) endA Hte} | Stratagene, La Jolla USA |
| C43 (DE3)* | <i>E. coli</i> F ⁻ dcm ompT hsdS _B (_{r_B⁻ m_B⁻) gal (DE3)} | Lucigen Corporation, Middleton USA |

*Der Stamm C43 (DE3) wurde aus dem Stamm BL21 (DE3) selektiert. Dieser Stamm enthält uncharakterisierte Mutationen und zeigt eine erhöhte Effizienz bei der Expression von Membranproteinen (Miroux & Walker, 1996).

II.1.5 Nährmedien zur Anzucht von *Escherichia coli*

LB-Medium: 1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl

2YT-Medium: 1,6% (w/v) Trypton, 0,8% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl

TB-Medium: 1,2% (w/v) Trypton, 2,4% (w/v) Hefeextrakt, 0,4% (v/v) Glycerin,
0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,6

2YT-Selektionsagarplatten: Für die Herstellung von Agarplatten wurde dem 2YT-Medium 1,5% (w/v) Agar hinzugefügt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen des Mediums auf etwa 55°C wurde das entsprechende Antibiotikum hinzugefügt und die Lösung in Petrischalen gegossen. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

II.1.6 Enzyme und Antikörper

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen und die dazugehörigen Puffer wurden von der Firma New England Biolabs (Frankfurt am Main) bezogen.

| | |
|--|-----------------------------|
| Tetra-His Antikörper | Qiagen, Hilden |
| ECL Maus IgG, HRP-gekoppelter Antikörper | GE Healthcare, München |
| Phusion Polymerase | NEB, Frankfurt am Main |
| Taq Polymerase | NEB, Frankfurt am Main |
| T4 DNA Ligase | Roche Diagnostics, Mannheim |

II.1.7 Vektoren und rekombinante Plasmide

Die Nomenklatur der Plasmide folgt dem System: (Ausgangsvektor)_(Abkürzung des Ursprungsorganismus)(Genname)(Mutation)

Zum Beispiel gilt für pET21a_AtAHP1^{H79A}-sGFP^{S65T}:

pET21a (Ursprungsvektor), At (Ursprungsorganismus *Arabidopsis thaliana*), AHP1 (Genname), H79A (Mutation der Aminosäure Histidin an Position 79 zu Alanin), s (synthetisch erzeugt), GFP (Genname), S65T (Mutation).

Das in dieser Arbeit verwendete sGFP ist ein synthetisch hergestelltes Gen, welches auf die Verwendung von Codons aus stark exprimierten humanen Proteinen optimiert wurde (Chiu *et al.*, 1996).

Eigenschaften der Ausgangsvektoren:

pET16b: Amp^r, N-terminaler Deka-Histidin-Tag, T7-RNA Polymerase Promotor

pET21a: Amp^r, C-terminaler Hexa-Histidin-Tag, T7-RNA Polymerase Promotor

pET30a: Kan^r, N-terminaler Hexa- Histidin-Tag, N-terminaler S-Tag, T7-RNA Polymerase Promotor

Die verwendeten Plasmide pET16b, pET21a und pET30a der Firma Invitrogen wurden bei der Klonierung der folgenden Expressionsvektoren eingesetzt:

Tabelle II-2: Eigenschaften der verwendeten Plasmide

| Vektorname | Genutzte Schnittstellen | Eingefügte Gene |
|---|--|---|
| pET16b_AtETR1 | <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> | AtETR1 |
| pET16b_AtETR1 ^{H353A} | <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> | AtETR1 |
| pET16b_AtETR1 ^{H353E} | <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> | AtETR1 |
| pET16b_AtETR1 ^{D659A} | <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> | AtETR1 |
| pET16b_AtETR1 ^{D659E} | <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> | AtETR1 |
| pET21a_AtAHP1 | <i>NdeI</i> und <i>XhoI</i> | AtAHP1 |
| pET21a_AtAHP1- sGFP ^{S65T} | <i>NdeI</i> und <i>XhoI</i> <i>XhoI</i> und <i>XmaI</i> | AtAHP1 sGFP ^{S65T} |
| pET21a_AtAHP1 ^{H79A} - sGFP ^{S65T} | <i>NdeI</i> und <i>XhoI</i> <i>XhoI</i> und <i>XmaI</i> | AtAHP1 sGFP ^{S65T} |
| pET21a_AtAHP1 ^{H79E} - sGFP ^{S65T} | <i>NdeI</i> und <i>XhoI</i> <i>XhoI</i> und <i>XmaI</i> | AtAHP1 sGFP ^{S65T} |
| pET15b_AtRTE1 | <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> | AtRTE1 |
| pET15b_AtRTE1 ^{C161Y} | <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> | AtRTE1 |
| pET30a_AtCTR1 | <i>NcoI</i> durch SLIC Methode (Li & Elledge, 2007) | AtCTR1 |
| pET21a_AtARR2 | <i>NdeI</i> und <i>HindIII</i> | AtARR2 |
| pRARE | | proL-, leuW-, metT-, argW-, thrT-, glyT-, tyrU-, thrU-, argU-, IleX-tRNA |

pET16b_AtETR1, pET16b_AtETR1^{H353A}

Bereitgestellt wurden diese Vektoren von Dr. J. Voet van Vormizeele (Voet van Vormizeele, 2006).

pET21a_AtAHP1, pET21a_AtAHP1-sGFP^{S65T}

Die Klonierung der Vektoren ist in Scharein *et al.* 2008 beschrieben.

pET21a_AtAHP1^{H79A}-sGFP^{S65T} und pET21a_AtAHP1^{H79E}-sGFP^{S65T}

Die Klonierung der Vektoren ist in Scharein & Groth 2011 beschrieben.

pET30a_AtCTR1

Bereitgestellt wurde dieser Vektor von Dipl.-Biol. K. Förster (Förster K., 2009).

pET21a_AtARR2

Bereitgestellt wurde der Ursprungsvektor pDONR221_AtARR2 von Prof. Dr. Klaus Harter (Uni Tübingen). Das AtARR2-Gen wurde durch die Oligonukleotide um die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *HindIII* verlängert. Die Klonierung des AtARR2-Gens erfolgte über die Schnittstellen *NdeI* und *HindIII* in den Vektor pET21a.

pRARE

Dieser kommerziell erhältliche Vektor (Novagen/Merck-Millipore, Darmstadt) enthält das Chloramphenicolacetyltransferasegen und kodiert zehn für in *E. coli* selten vorkommende tRNAs.

II.1.8 Oligonukleotide

Für die Mutation von Genen oder das Anfügen von Restriktionsschnittstellen wurden die folgenden Oligonukleotide mit den entsprechenden Sequenzen verwendet. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich (München) bezogen.

Tabelle II-3: Verwendete Oligonukleotide zur DNA-Amplifikation und gerichteten Mutation

| Oligonukleotidname | Sequenz | Funktion |
|------------------------|--|--|
| 5'-AHP1_H79A | GTT GAT CCC CAT GTT GCT CAA CTC AAA GGT AGC | Mutation H79A des AtAHP1 Gens |
| 5'-AHP1_H79E | GTT GAT CCC CAT GTT GAG CAA CTC AAA GGT AGC | Mutation H79E des AtAHP1 Gens |
| 5'-ETR1_H353E | A GCG GTT ATG AAC GAA GAA ATG CGA ACA CC | Mutation H353E des AtETR1 Gens |
| 5'-ETR1_D659A | GTG GTC TTC ATG GCC GTG TGC ATG CCC GGG GTC | Mutation D659A des AtETR1 Gens |
| 5'-ETR1_D659E | GTC TTC ATG GAG GTG TGC ATG CCC GGG GTC GAA | Mutation D659E des AtETR1 Gens |
| T7 Promotor | TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG | Sequenzierung von pET Vektoren |
| T7 Terminator | GCT AGT TAT TGC TCA GCG G | Sequenzierung von pET Vektoren |
| 5'- <i>NdeI</i> _RTE1 | CGA AGT ATC ATA TGT CAC GTG GAA G | Fügt N-Terminal eine <i>NdeI</i> Schnittstelle ein |
| 3'- <i>BamHI</i> _RTE1 | CGT TCA TAG GAT CCA GTA ATT ATG TTC | Fügt C-Terminal eine <i>BamHI</i> Schnittstelle ein |

| Oligonukleotidname | Sequenz | Funktion |
|--------------------|---|---|
| 5'-RTE1_C161Y | TTC ACT TGT AAC TAC CAT TCG TTT GTT | Mutation C161Y des AtRTE1 Gens |
| 5'-NdeI_AtARR2 | A GCT AGC GTA AAT CCG GGT CAC GGA | Fügt N-Terminal eine NdeI Schnittstelle ein |
| 3'-HindIII_AtARR2 | TG AAG CTT AAC CTG TTT GAG AAA TGC GCT | Fügt C-Terminal eine HindIII Schnittstelle ein |

II.2 Molekularbiologische Methoden

Alle aufgeführten molekularbiologischen Methoden sind, wenn nicht anders angegeben, dem Buch „Molecular cloning – a laboratory manual“ entnommen (Sambrook *et al.*, 1989).

II.2.1 DNA-Amplifikation und gerichtete Mutation mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die Amplifizierung von DNA für die Klonierung und das Einbringen von Restriktionsschnittstellen wurde die 1988 beschriebene Methode von Saiki *et al.* verwendet. Bei der Verwendung von Taq Polymerase (NEB) wurde die Hybridisierungstemperatur 4°C unter der Schmelztemperatur der Oligonukleotide gewählt, um eine Bindung der Polymerase an die DNA zu ermöglichen. Wurde die Phusion Polymerase (NEB) verwendet, wurde die Hybridisierungstemperatur 3°C über der Schmelztemperatur der Oligonukleotide gewählt, da die DNA durch das fusionierte *doublestrand-binding*-Protein auch bei höheren Temperaturen gebunden wird und somit unspezifische Bindungen verringert werden. In den klonierungsrelevanten Ansätzen wurde für eine möglichst hohe Genauigkeit die

Phusion Polymerase eingesetzt. Für Test-PCRs wurde die Taq Polymerase verwendet. Für beide Polymerasen wurden die Puffer, die von den entsprechenden Firmen mitgeliefert wurden, verwendet.

Für die Mutation von Genen erfolgte die Amplifikation nach der 1997 von Ke und Madison beschriebenen „Megaprimer PCR“ Methode.

II.2.2 Chromatographische Trennung von DNA-Fragmenten durch Agarosegelelektrophorese

Die Gelelektrophorese trennt in einem Agarosegel, welches als molekulares Sieb fungiert, DNA Fragmente ihrer Größe entsprechend auf.

Standardmäßig wurden Agarosegele mit einer Agarosekonzentration von 1% (w/v) verwendet. Die Agarose wurde in TBE Puffer (0,89 M TRIS/Borat pH 8,0, 1,21 M Borsäure, 32 mM EDTA) bei 100°C gelöst und bei 60°C gelagert. Vor der Verwendung wurde das Agarosegel mit 0,5 mg/l Ethidiumbromid versetzt. Die Elektrophorese erfolgte in TBE Puffer.

Für die chromatographische Trennung wurden die Proben mit 1/10 Volumen DNA Probenpuffer (50% (w/v) Glycerin, 0,1% (w/v) Bromphenolblau) versetzt und im Agarosegel bei 150 V für 60 min aufgetrennt. Die Auswertung der Trennung erfolgte mit dem Geldokumentationssystem BioDocAnalyse der Firma Biometra.

Zur Bestimmung der DNA-Fragmentgröße wurde der Größenstandard „1kb DNA Ladder“ der Firma NEB verwendet.

II.2.3 Isolierung von DNA aus Agarosegel

Die Isolation von DNA aus Agarosegelen erfolgte nach den Herstellervorgaben des kommerziell erhältlichen QIAquick Gel Extraction-Kits.

II.2.4 Hydrolytische Spaltung von DNA mittels

Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA erfolgte unter Verwendung von Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs (NEB, Frankfurt am Main) in den mitgelieferten Puffern.

Für die Spaltung von 1 µg DNA wurden 5 bis 10 U Enzym eingesetzt. Der Standardansatz wurde bei 37°C für zwei Stunden inkubiert und danach bei 65°C für 20 min inaktiviert. Die gespaltene DNA wurde chromatographisch über ein Agarosegel aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente aus dem Agarosegel isoliert (siehe II.2.2 und II.2.3).

II.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

Die Ligation von DNA-Fragmenten (Insert) erfolgte unter Verwendung von T4-DNA Ligase der Firma Roche in dem mitgelieferten Puffer. Eingesetzt wurde ein molares Verhältnis von 3:1 Insert zu Vektor. Für die Ligation von 50 µg DNA wurden 1 U Enzym verwendet. Der Ansatz wurde bei 14°C für mindestens 16 Stunden inkubiert.

II.2.6 Kontrolle der Vektor – Insert-Ligation mittels

Polymerasekettenreaktion (Kolonie-PCR)

Für die Kontrolle des Vektors auf das Vorhandensein des inserierten DNA-Fragments, wurden die ligierten Plasmide in den *E. coli* Stamm XL1blue transformiert (siehe II.3.2) und auf einer Agarplatte ausplattiert. Die entstandenen Kolonien wurden in 20µl NP40 Puffer (50 mM TRIS/HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1% (v/v) NP 40) resuspendiert, bei 95°C für 10 min aufgeschlossen und die Plasmide durch Zentrifugation für 5 min bei 10.000 x g von den Zellbestandteilen separiert. In einer anschließenden klassischen PCR (siehe II.2.1) mit Taq Polymerase und den T7-Promoter und T7-Terminator Oligomeren (siehe II.1.8) erfolgte die Amplifikation der Plasmide. Die Kontrolle erfolgte durch Größenvergleich mit einem DNA Größenmarker in einer Agarosegelelektrophorese.

II.2.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Die Isolation von Plasmid-DNA basiert auf der Methode der alkalischen Lyse von Bakterienzellen (Birnboim & Doly, 1979).

Eine 5 ml Übernachtskultur von transformierten XL1blue-Zellen wurde durch Zentrifugation pelletiert und die Plasmide mit dem *QIAprep Spin Miniprep*-Kit der Firma Qiagen isoliert.

Die gereinigte DNA wurde mit 50 µl sterilem H₂O eluiert. Die DNA Konzentration wurde wie unter II.4.1 beschrieben spektrometrisch bestimmt und die Lösung bei -20°C gelagert.

II.3. Mikrobiologische Methoden

II.3.1 Herstellung von chemisch kompetenten *Escherichia coli* Zellen

Die für spätere Anwendungen benötigten *E. coli* Zellen wurden nach der Rubidiumchlorid-Methode von Hanahan (1983) chemisch kompetent gemacht. Hierfür wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml Vorkultur des entsprechenden *E. coli*-Stammes inokuliert und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,5 unter Schütteln inkubiert. Nach dem Zentrifugieren bei 2000 × g und 4°C für 5 min wurden die Zellen in 20 ml eiskaltem TFB I-Puffer (30 mM Kaliumacetat pH 5,8, 10 mM CaCl₂, 100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 15% (w/v) Glycerin) resuspendiert. Nach 5 min Inkubation wurde die Suspension erneut bei 2000 × g und 4°C für 5 min pelletiert und in 4 ml eiskaltem TFB II-Puffer (10 mM MOPS pH 6,5, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 15% (w/v) Glycerin) resuspendiert und 30 min inkubiert. Die nun kompetenten Zellen wurden zu je 50 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

II.3.2 Transformation von chemisch kompetenten *Escherichia coli*

Zellen nach Hanahan (1983)

50 µl kompetente Zellen (siehe II.3.1) wurden mit 50 bis 200 ng Plasmid DNA gemischt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Für die Transformation wurde der Ansatz für 90 Sekunden bei 42°C inkubiert und sofort wieder für zwei Minuten auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 300 µl LB Medium wurde der Ansatz für 30 - 60 Minuten bei 37°C unter Schütteln bis zur phänischen Expression der Antibiotikum-Resistenz inkubiert. Der Ansatz wurde auf vorgewärmte Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

II.3.3 Überexpression von AHP1, AHP1-GFP^{S65T}, AHP1^{H79A}-GFP^{S65T} und AHP1^{H79E}-GFP^{S65T} in BL21 Gold (DE3)-Zellen

Transformierte BL21 Gold (DE3)-Zellen (siehe II.3.2), die das Plasmid pET21a_AtAHP1 beziehungsweise pET21a_AtAHP1_sGFP^{S65T} tragen, wurden in 50 ml 2YT Medium mit 100 µg/ml Ampicillin bei 37°C und 190 Upm über Nacht inkubiert. 500 ml TB Medium mit 100 µg/ml Ampicillin wurden mit 10 ml der Vorkultur inokuliert und bei 37°C und 190 Upm bis zu einer optischen Dichte von 0,4-0,6 kultiviert. Im Anschluss daran wurde die Kultur für eine halbe Stunde auf 12°C heruntergekühlt. Bei einer OD₆₀₀ von 0,8 wurde der T7-Promotor mit 0,1 mM IPTG induziert. Die Überexpression des Proteins erfolgte bei 12°C für weitere 18 h. Die Zellmasse wurde bei 7000 x g und 4°C für 10 min pelletiert und in Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

II.3.4 Überexpression von ETR1-Protein in C43 (DE3)-Zellen

Die Expressionsbedingungen wurden aus der Dissertation von Dr. J. H. Voet van Vormizeele (2006) und Scharein *et al.* 2008 übernommen.

II.3.5 Überexpression von CTR1 in BL21 (DE3)pRARE-Zellen

Für die Überexpression von CTR1 wurde der *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) verwendet, der zusätzlich das Plasmid pRARE trägt. Das pRARE-Plasmid codiert für tRNAs, die in *E. coli* selten vorkommen. Damit kann rekombinante DNA exprimiert werden, dessen DNA mit anderen Codons codiert ist.

In die BL21 (DE3)pRARE-Zellen wurde das pET30a_AtCTR1 Plasmid transformiert (II.3.2). Mit einer Kolonie wurden 50 ml 2YT Medium inokuliert und mit 25 µg/ml

Kanamycin und 34 µg/ml Chloramphenicol versetzt. Diese Vorkultur wurde bei 37°C und 180 Upm über Nacht inkubiert. Mit 40 ml Vorkultur wurden 500 ml Hauptkultur angeimpft und mit 2% (v/v) Ethanol, 25 µg/ml Kanamycin und 34 µg/ml Chloramphenicol versetzt. Bei 37°C und 180 Upm erfolgte die Kultivierung der Bakterien bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4. Die Kultur wurde dann bei 16°C und 180 Upm inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,8 wurde die Expression mit 0,25 mM IPTG induziert. Die Überexpression erfolgte über Nacht bei 16°C und 180 Upm. Am nächsten Morgen erfolgte die Zentrifugation des Mediums bei 7000 x g und 4°C für 10 min. Das Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

II.3.6 Überexpression von RTE1 und RTE1^{C161Y} in BL21 Gold (DE3)-Zellen

E. coli BL21 Gold (DE3)-Zellen wurden mit dem Plasmid pET15b_RTE1 beziehungsweise pET15b_RTE1^{C161Y} transformiert (II.3.2). Eine 50 ml 2YT Vorkultur wurde mit den transformierten Zellen inokuliert und mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt. Mit der über Nacht bei 37°C und 190 Upm inkubierten Vorkultur wurden 500 ml 2YT Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,05 eingestellt. Nach Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin wurde die Kultur bei 37°C und 190 Upm bei zu einer OD₆₀₀ von 0,7 wachsen gelassen. Die Überexpression des Proteins wurde durch Zugabe von 0,3 mM IPTG induziert. Nach 4 Stunden erfolgte die Zentrifugation des Kulturmediums bei 7000 x g und 4°C für 10 min. Das Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

II.3.7 Überexpression von ARR2 in BL21 Gold (DE3)-Zellen

Für die Vorkultur wurde eine Kolonie von BL21 Gold (DE3)-Zellen, die zuvor mit dem Plasmid pET21a_AtARR2 transformiert wurden (II.3.2), in zweimal 500 ml 2YT-Medium überführt, mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt und über Nacht bei 37°C und 180 Upm inkubiert. 15 schikanierte 1 L Kolben mit je 500 ml 2YT-Medium wurden mit der Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt, mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert. Die Expression des Proteins wurde durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert und das Kulturmedium für weitere 18 Stunden bei 37°C und 180 Upm inkubiert. Danach folgte die Separation der Zellen durch Zentrifugation bei 7000 × g und 4°C für 10 min. Das Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

II.3.8 Aufschluss von *Escherichia coli* Zellen

II.3.8.1 Aufschluss von *Escherichia coli* Zellen mit einem

Hochdruckhomogenisator (French Press)

Die Hochdruckzelle und periphere Teile wurden vor der Verwendung auf 4°C gekühlt. Für den Aufschluss von *E. coli*-Zellen wurden die Zellen im Verhältnis 1 zu 5 in dem jeweiligen Aufschlusspuffer resuspendiert und mit DNase I versetzt. Bei einem Druck von 20.000 psi wurde die Zellsuspension aufgeschlossen.

II.3.8.2 Aufschluss von *Escherichia coli*-Zellen mittels Ultraschall

Durch einen Hochfrequenzgenerator wird elektrische Energie mittels Schallwandler in mechanische vertikale Schwingungen umgewandelt. Über eine Titan-Sonotrode wird in einer Flüssigkeit eine Kavitation erzeugt, wodurch Zellen homogenisiert

werden. Die Sonotrode wurde in die Zellsuspension getaucht und auf Stufe 2 bei 50% Anschaltdauer dreimal 30 Sekunden mit je 1 Minute Pause beschallt.

II.4 Proteinpräparation

II.4.1 Reinigung von AHP1 und AHP1-GFP^{S65T} unter nativen

Bedingungen durch immobilisierte Metallionen- Affinitätschromatographie (IMAC)

Eine Zellmasse von 1 g (vgl. II.3.3) wurde in 5 ml AHP-Aufschlusspuffer (30 mM Bis-Tris/HCl pH 6,0, 150 mM NaCl, 30 mM Imidazol, 10% (v/v) Glycerin, 0,002% (v/v) PMSF) resuspendiert und mit dem Ultraschalldesintegrator aufgeschlossen (II.3.8.2). Das Homogenisat wurde bei 10000 x g und 4°C für 15 min zentrifugiert. 250 µl Ni-NTA wurden in einer Säule mit 8 mm Durchmesser gegeben und mit 2,5 ml AHP-Aufschlusspuffer äquilibriert. Für die Bindung des Proteins wurde der Überstand nach der Zentrifugation auf die Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule mit 5 ml Waschpuffer I (30 mM Bis-Tris/HCl pH 6,0, 150 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin) und 7,5 ml Waschpuffer II (30 mM Bis-Tris/HCl pH 6,0, 150 mM NaCl, 50 mM Imidazol, 10% (v/v) Glycerin) gewaschen. Mit 2,5 ml Elutionspuffer I (30 mM Bis-Tris/HCl pH 6,0, 150 mM NaCl, 70 mM Imidazol, 10% (v/v) Glycerin) und mit 2,5 ml Elutionspuffer II (30 mM Bis-Tris/HCl pH 6,0, 150 mM NaCl, 90 mM Imidazol, 10% (v/v) Glycerin) wurde das Protein eluiert. Die beiden Elutionsfraktionen wurden vereinigt.

II.4.2 Reinigung von ETR1 unter denaturierenden Bedingungen durch immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)

16 – 18 g der Zellmasse wurden in 50 ml Puffer H (50 mM TRIS/HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, 15% Glycerin, 0,002% (w/v) PMSE, 2 mM DTT) resuspendiert und durch Hochdruckhomogenisation (siehe II.3.8.1) in der French Press zweimal aufgeschlossen.

Die Zellmembran mit dem Membranprotein wurden 30 min bei 40000 x g und 4°C pelletiert, in 25 ml Puffer J (50 mM TRIS/HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, 15% Glycerin) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Diese Membranpellets wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3 bis 4 g ETR1-Membranpellet (II.3.4) wurde in 10 ml Puffer G (20 mM TRIS/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 8 M Harnstoff) resuspendiert und bei 37°C unter Rühren für 60 bis 90 min solubilisiert. Nach 30 min Zentrifugation bei 20°C mit 30000 x g wurde der Überstand abgenommen und mit 20 mM Imidazol versetzt. 2 ml Ni-NTA wurden in eine Säule (8 mm Durchmesser) gefüllt und mit 20 ml Puffer G äquilibriert. Für die Proteinbindung wurde der Überstand der zentrifugierten Proteinlösung über die Säule gegeben. Die Reinigung erfolgte mit 20 ml Puffer G und 60 ml Puffer G mit 50 mM Imidazol. Durch 12 ml Puffer G mit 250 mM Imidazol wurde das ETR1-Protein eluiert. Die Probe wurde in einem 50 kDa Ultrafiltrator auf 1 ml konzentriert (siehe II.5.2), mit 10 ml Puffer G verdünnt und erneut auf 1 ml konzentriert.

II.4.2.1 Renaturierung von denaturierend gereinigtem ETR1

Um Aggregate zu entfernen, wurde vor der Renaturierung das gereinigte ETR1-Protein (siehe II.4.2) für 30 min bei 20°C und 35.000 Upm im SW55-Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 100 mM DTT versetzt und mit Puffer G (20 mM TRIS/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 8 M Harnstoff) auf 0,8 mg/ml verdünnt. 10 Ansätze mit jeweils 500 µl denaturierter ETR1-Lösung wurden durch Zugabe von 10 ml eiskaltem Puffer R1 (55 mM TRIS/HCl pH 8,0, 264 mM NaCl, 11 mM KCl, 0,1% (w/v) DDM, 1,1 mM EDTA, 10 mM DTT, 0,002% (w/v) PMSF) verdünnt. Die Proteinlösung wurde bei 8°C und 50.000 Upm im Ti70.1 Rotor für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem 50 kDa Ultrafiltrator auf 1,5 ml konzentriert (siehe II.5.2), mit Puffer R2 (55 mM TRIS/HCl pH 8,0, 264 mM NaCl, 11 mM KCl, 0,1% (w/v) DDM, 2 mM DTT) auf 15 ml aufgefüllt und erneut auf 1,5 ml konzentriert. Anschließend wurde die Probe in KO Puffer (50 mM TRIS/HCl pH 7,5, 100 mM KCl, 0,1% (w/v) DDM, 0,002% (w/v) PMSF) umgepuffert (siehe II.5.1), auf 500 µl konzentriert und bei 8°C und 35.000 Upm für 30 min im SW55 Rotor zentrifugiert. Für die Messungen wurde der Überstand verwendet.

II.4.3 Reinigung von CTR1 unter nativen Bedingungen durch

immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)

Die, wie in II.3.5 beschrieben, hergestellten BL21 (DE3)pRARE-Zellpellets, die CTR1 Protein überexprimiert haben, wurden in CTR1-Aufschlusspuffer (50 mM TRIS/HCl pH 7,6, 300 mM NaCl, 6% (v/v) Glycerin, 0,002% (w/v) PMSF) resuspendiert und im Hochdruckhomogenisator aufgeschlossen (II.3.8.1). Das Homogenisat wurde für 30 min bei 4°C und 40.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde ein weiteres Mal für 1 Stunde bei 4°C und 100.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde durch eine Membran mit 0,45 µm Porengröße filtriert und auf Eis gestellt. Die Reinigung erfolgte über eine HisTrap-Säule, die an einer ÄKTA Prime FPLC-Anlage bei 4°C mit

20 Säulenvolumen CTR1-Aufschlusspuffer äquibriert wurde. Mit einer Flussrate von 1 ml/min wurde die Proteinlösung über die Säule gepumpt. Die Säule wurde mit Aufschlusspuffer gespült, bis die Absorption bei 280 nm einen konstanten Wert erreichte. Um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, wurde mit CTR1-Aufschlusspuffer und 50 mM Imidazol gespült, bis die Absorption wieder konstant war. Die Elution des CTR1-Proteins erfolgte mit CTR1-Elutionsspuffer (50 mM TRIS/HCl pH 7,6, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, 6% (v/v) Glycerin, 0,002% (w/v) PMSF). Die Elution wurde in Fraktionen à 1 ml gesammelt. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt.

II.4.4 Reinigung von RTE1 und RTE1^{C161Y} unter nativen Bedingungen durch immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)

Die in II.3.6 hergestellten Zellen, die das überexprimierte Protein RTE1 beziehungsweise RTE1^{C161Y} enthalten, wurden in RTE1-Aufschlusspuffer (30 mM TRIS/H₂SO₄ pH 7,5, 200 mM NaCl, 0,002% (w/v) PMSF) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde im Hochdruckhomogenisator aufgeschlossen (II.3.8.1), und die Zellmembran bei 100.000 x g in der Ultrazentrifuge für 60 min bei 4°C pelletiert. Das Membranpellet wurde im selben Volumen Aufschlusspuffer resuspendiert. Das Membranprotein RTE1 wurde aus der Membran durch Zugabe von 1% (w/v) FOS-CHOLINE-15 (Anatrace, Maumee, USA) solubilisiert und bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Die nicht löslichen Bestandteile wurden bei 100.000 x g erneut pelletiert und verworfen.

Eine Säule (0,5 cm Durchmesser und 7 cm Länge) wurde mit 2 ml Nickel-Iminodiessigsäureagarose (Ni-IDA) gefüllt und mit RTE1-Reinigungspuffer (30 mM TRIS/H₂SO₄ pH 7,5, 200 mM NaCl, 0,05% (w/v) FOS-CHOLINE-15, 0,002% (w/v)

PMSF) äquilibriert. Die Membranproteinlösung wurde durch diese Säule laufen gelassen und in 3 Waschschrinen mit je 20 ml RTE1 Reinigungspuffer und einer steigenden Konzentration von 25 mM, 50 mM und 100 mM Imidazol gewaschen. Mit 20 ml RTE1-Reinigungspuffer plus 250 mM Imidazol wurde das Protein wieder von der Säule gelöst.

II.4.5 Reinigung von ARR2 unter nativen Bedingungen durch immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)

BL21 Gold (DE3)-Zellen (17 g), die das überexprimierte ARR2-Protein enthalten, wurden in 85 ml ARR2-Waschpuffer A (50mM TRIS/HCl pH 7,5, 100mM NaCl) resuspendiert und mit 0,002% (w/v) PMSF versetzt. Nach dem Zellaufschluss mittels Hochdruckhomogenisator (II.3.8.1), folgte eine 30 minütige Zentrifugation bei 45.000 x g und 4°C im JA 25.50 Rotor um die Proteinlösung von den Zellfragmenten zu trennen. Die Reinigung des ARR2-Proteins erfolgte durch Bindung an eine mit 2,5 ml Ni-NTA gefüllte Säule (8 mm Durchmesser) die zuvor mit 20 ml ARR2-Waschpuffer A äquilibriert wurde. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Fremdproteine wurden die Säule mit 200 ml ARR2-Waschpuffer B (50mM TRIS/HCl pH 7,5, 100mM NaCl, 20 mM Imidazol) gespült. Die Elution des ARR2-Proteins erfolgte mit 12 ml ARR2-Elutionspuffer (50mM TRIS/HCl pH 7,5, 100mM NaCl, 250 mM Imidazol). Um das Imidazol zu entfernen, wurde die Proteinlösung in ARR2-Waschpuffer A umgepuffert.

II.5. Proteinbiochemische Methoden

II.5.1 Umpuffern einer Proteinlösung mit einer Entsalzungssäule vom Typ PD10

Für das Umpuffern von Proteinlösungen wurden kommerziell erhältliche PD10 Entsalzungssäulen verwendet. Das Sephadex G25 Medium in den Säulen funktioniert dabei nach dem Prinzip der Größenausschlusschromatographie. Kleine Moleküle können in die poröse Säulenmatrix eindringen und eluieren dementsprechend später als große Moleküle, die nicht mit der Matrix interagieren.

Die Entsalzungssäulen wurden nach den Herstellervorgaben äquilibriert und die Proteinproben wie im Handbuch beschrieben umpuffert.

II.5.2 Konzentrieren einer Proteinlösung durch Ultrafiltration

Die Ultrafiltration ist ein Verfahren zur Trennung von Partikeln. Wie bei der Dialyse, lässt eine semipermeable Membran kleine Moleküle wie Wasser, Salze und kleine Proteine passieren und hält größere Moleküle zurück. Das Konzentrieren der Proteinprobe erfolgte nach den Herstellervorgaben bei 5.000 x g bis zum Erreichen des benötigten Volumens.

II.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Trennung von Proteinen wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE (modifiziert nach Laemmli, 1970) eingesetzt.

Die in dieser Arbeit verwendeten SDS-PAGE-Gele wurden in drei unterschiedlichen Konzentrationen angesetzt. Trenngele wurden in Acrylamid-Konzentrationen von 10%, 12% oder 15% (w/v) verwendet. Das Sammelgel wurde mit einer Acrylamidkonzentration von 5% (w/v) eingesetzt. Die Gele wurden in den Größen 6 x 8 cm und 28 x 34 cm mit je einer Dicke von 1,5 mm hergestellt. Für kleine Gele wurden nur 10% der angegebenen Mengen verwendet. Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit $\frac{1}{4}$ Volumen SDS Probenpuffer (30 mM TRIS, 30 mM Borsäure, 0,7 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 6,7% (w/v) SDS, 16,7% (w/v) Saccharose, 0,16% (w/v) Bromphenolblau) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte in Elektrophoresepuffer (25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 0,05% (w/v) SDS) bei 50 mA.

Tabelle II-4: Mengenangaben für die Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen

| | Sammelgel (5%) | Trenngel (10%) | Trenngel (12%) | Trenngel (15%) |
|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Acrylamidlösung | 10 ml | 66,7 ml | 80 ml | 100 ml |
| Sammelgelpuffer | 12 ml | - | - | - |
| Trenngelpuffer | - | 77 ml | 77 ml | 77 ml |
| Wasser | 37,6 ml | 55,5 ml | 42,2 ml | 22,2 ml |
| TEMED | 0,06 ml | 0,1 ml | 0,1 ml | 0,1 ml |
| 10% (w/v) APS | 0,4 ml | 0,7 ml | 0,7 ml | 0,7 ml |

| | | |
|----------------------|--|---|
| Acrylamidlösung | Trenngelpuffer | Sammelgelpuffer |
| 30%ige Acrylamid | 1,875 M TRIS/H ₃ PO ₄ pH 8,9 | 0,25 M TRIS/H ₃ PO ₄ pH 6,7 |
| 0,8%ige Bisacrylamid | 0,25% (w/v) SDS | 0,5% (w/v) SDS |

II.5.4 Silberfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Das Verfahren der Silberfärbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen wurde nach der Methode von Heukeshoven (1988) durchgeführt. Die eingesetzten Ag^+ -Ionen bilden mit den Aminosäureresten Glutamat, Aspartat und Cystein Komplexe aus. Durch formaldehydhaltige Natriumcarbonatlösung werden die Ag^+ -Ionen zu elementarem Silber reduziert. Die Nachweisgrenze von Proteinen liegt bei diesem Verfahren bei bis zu 0,05 ng.

Tabelle II-5: Zeitlicher Ablauf der einzelnen Inkubationsschritte für eine Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

| | Kleine Gele | | Große Gele | |
|--------------------|-------------|-----------|------------|-------------|
| | Menge | Zeit | Menge | Zeit |
| Fixierer | 50 ml | 10 min | 200 ml | 30 - 60 min |
| Inkubator | 50 ml | 10 min | 200 ml | 30 min |
| Wasser | 50 ml | 3 x 5 min | 200 ml | 3 x 10 min |
| Silbernitratlösung | 50 ml | 10 min | 200 ml | 30 min |
| Entwicklerlösung | 50 ml | 1 – 5 min | 200 ml | 1 – 5 min |
| Stopplösung | 5 ml | - | 20 ml | - |

Entwickelte Gele wurden in Plastikfolie eingeschweißt und mit einem Scanner (HP Scanjet 4850) mit 300 dpi digitalisiert.

| | | | |
|----------------|--|--------------------|-------------------------------|
| Fixierer | Inkubator | Silbernitratlösung | Entwicklerlösung |
| 30% Ethanol | 30% Ethanol | 0,1% Silbernitrat | 2,5% Na_2CO_3 |
| 10% Essigsäure | 0,5% Na-Acetat 0,2% $\text{Na}_2\text{O}_3\text{S}_2$ | 0,02% Formaldehyd | 0,02% Formaldehyd |
| Stopplösung | | | |
| 2,3 M Citrat | | | |

II.5.5 Transfer und Immobilisierung von Proteinen auf einer Membran (Western Blot)

Die für diese Arbeit angefertigten *Western Blots*, beruhen auf der Methode von Towbin *et al.* (1979). Der Proteintransfer wurde im „*semi dry*“-Verfahren durchgeführt. Für lösliche Proteine wurde Nitrocellulose als Membran verwendet. Für hydrophobe Proteine, wie Membranproteine, wurde PVDF als Membran eingesetzt. Die PVDF-Membran wurde vor Verwendung in 100% Ethanol aktiviert. Die Membranen wurden vor dem Transfer für 10 min mit Transferpuffer (25 mM TRIS, 190 mM Glycin, 10% (v/v) Ethanol) äquilibriert. Die zu untersuchenden Proteinproben wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe II.5.3). Das SDS-Polyacrylamidgel wurde für 10 min in Transferpuffer äquilibriert. In die Blot-Apparatur wurden drei mit Transferpuffer getränkte Filterpapierlagen, die Membran, das SDS-Polyacrylamidgel und weiteren drei Filterpapierlagen gestapelt. Der Transfer erfolgte bei 0,8 bis 1 mA/cm² für 90 min. Der Transfererfolg wurde durch Färben mit Ponceau S Färbelösung (0,5% (w/v) Ponceau S, 1% (v/v) Essigsäure) ermittelt. Die Membran wurde in Plastikfolie eingeschlagen, digitalisiert und anschließend wieder mit Wasser entfärbt.

II.5.6 Immunologischer Nachweis von Oligo-Histidin-markierten Proteinen

Für die antikörperspezifische Reaktion wurde die Membran, auf die Proteine immobilisiert wurden, für 10 min in TBS-Puffer (10 mM TRIS/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) und anschließend für eine Stunde in Caseinlösung (1% (w/v) Casein in TBS-Puffer), zur Absättigung von offenen Bindestellen der Membran, inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte in TBT-Puffer (20 mM TRIS/HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,5% (v/v) Tween 20) und ein Waschschrte in TBS-Puffer für jeweils 10 Minuten. Die

Bindung des 1:10.000 in Caseinlösung verdünnten Primärantikörpers Tetra-His-Antikörper erfolgte für 16 Stunden bei 4°C. Ungebundene Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen mit TBT- und einmaligem Waschen mit TBS-Puffer entfernt. Danach folgte eine Inkubation der Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem 1:10.000 in Caseinlösung verdünnten Sekundärantikörper ECL Maus IgG HRP-gekoppelten Antikörper. Um den ungebundenen Sekundärantikörper zu entfernen, wurde die Membran erneut für je 10 Minuten zweimal in TBT- und einmal in TBS-Puffer gewaschen. Der selektive Nachweis der Histidin-markierten Proteine erfolgte über die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase mittels Immobilon Western Chemilumineszenz HRP Substrats. Die Chemilumineszenzreaktion an der gesuchten Proteinbande wurde mit dem Lumineszenzdetektor LAS 1000 detektiert und digitalisiert.

II.5.7 Dansylierung von Proteinen

Mit der angepassten Methode von Banik *et al.* (1993) kann die fluoreszierende Substanz Dansylchlorid kovalent an Proteine gebunden werden. Es bindet hauptsächlich an primäre Aminogruppen in aliphatischen und aromatischen Aminen. Unter optimalen Bedingungen bindet das Dansyl bevorzugt an die N-ständige Aminosäure.

Dansylchlorid wurde wegen seiner Instabilität in Dimethylsulfoxid (DMSO) in Dimethylformamid (DMF) gelöst. Das Dansylchlorid wurde in einer molaren Konzentration in DMF angesetzt, die dem 200-fachen der Proteinkonzentration entsprach. Für die Reaktion wurde ein Protein-/Dansylchlorid-Verhältnis von 1:20 gewählt, was einer DMF Endkonzentration von 5% (v/v) entsprach. Die Probe wurde für 60 min bei Raumtemperatur im Dunkelschrank inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von TRIS/HCl pH 7,5 in einer Endkonzentration von 50 mM

gestoppt. Ungebundenes Dansylchlorid wurde durch eine PD10 Entsalzungssäule entfernt (II.5.1).

Der Dansylierungsgrad wurde spektroskopisch über den Extinktionskoeffizienten ($4500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, Hsieh, 1985) bei 340 nm bestimmt (II.6.1).

II.6 Spektroskopische Methoden

II.6.1 Spektroskopische Konzentrationsbestimmung

Mit dem Spektralphotometer DU800 wurde die Absorption der Probe bei einer bestimmten Wellenlänge ermittelt. Um die Konzentration zu ermitteln, wurde die Formel von Lambert-Beer nach der Konzentration umgeformt:

$$c = \frac{E}{\epsilon \times d} \quad (\text{Formel 1})$$

c = Konzentration [$\mu\text{g/ml}$] oder [mol/l]

E = Absorption

ϵ = Molarer Extinktionskoeffizient

ϵ_{DNA} = spezifischer Extinktionskoeffizient bei 260 nm von DNA ($0,02 \text{ ml}/\mu\text{g}$)

$\epsilon_{\text{Dansylchlorid}}$ = Molarer Extinktionskoeffizient bei 340 nm von Dansylchlorid ($4500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

d = Schichtdicke der Messküvette (1 cm)

Für die Bestimmung der Reinheit von DNA wurde der Quotient der Absorption bei 280 nm und 260 nm gebildet. Für eine hohe Reinheit sollte der Quotient 1,8 - 2,0 betragen.

II.6.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Der Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue* zeigt in sauren Lösungen eine Verschiebung seines Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm durch die Bindung an Proteine (Bradford, 1976).

Für die Konzentrationsbestimmung wurde 1 µl der Proteinprobe in 100 µl Wasser gelöst und mit 900 µl Bradfordlösung (1:5 verdünnt; Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad, München) versetzt. Eine Kalibrierreihe mit Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin*, BSA) in den Konzentrationen 0, 2, 4, 6, 8 und 10 µg/ml wurde zeitgleich erstellt. Um Effekte durch die Pufferzusammensetzung zu berücksichtigen, wurde jeweils 1 µl Puffer, in dem das Protein vorlag, in die Kalibrierreihe eingesetzt. Nach 5 min Inkubation wurde die Absorption der Probe und der Kalibrierreihe im DU800 spektroskopisch bei 595 nm ermittelt.

II.6.3 Proteinkonzentrationsbestimmung durch Bicinchoninsäure

In Anwesenheit von Proteinen wird durch die Biuret-Reaktion komplexiertes Cu^{2+} zu Cu^+ reduziert. Die Bicinchoninsäure (*bicinchoninic acid*, BCA) reagiert in basischen Lösungen mit einwertigen Kupferionen zum violetten Cu^+ -Bicinchoninsäurekomplex. Die Absorption dieses Komplexes liegt bei 562 nm.

Für die Konzentrationsbestimmung wurde das kommerzielle BCA-Reagenz nach Herstellervorgaben (BCA-Reagenz, Thermo Scientific/Pierce, Schwerte) angesetzt und je 1 ml für eine Kalibriergerade mit 0, 2, 4, 6, 8 und 10 µg/ml BSA gemischt. Von der Probe wurde 1 µl mit 1 ml Reagenz gemischt. Die Ansätze wurden für 30 min bei 37°C inkubiert und die Absorption bei 562 nm spektralphotometrisch gemessen.

II.6.4 Cirkulardichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) von Proteinen

In der CD-Spektroskopie wird zirkular polarisiertes Licht, also um 90° überlagerte zueinander phasenverschobene elektromagnetische Wellen, von optisch aktiven Molekülen unterschiedlich stark absorbiert. Asymmetrische Moleküle, wie Proteine, sind unter anderem durch ihre Sekundärstrukturen optisch aktiv. Diese optisch aktiven Moleküle haben unterschiedliche Extinktionskoeffizienten ϵ_L und ϵ_R und erzeugen elliptisch polarisiertes Licht. Die Differenz zwischen den unterschiedlichen Absorptionen ϵ_L und ϵ_R wird in Elliptizität (Θ) angegeben.

$$\Theta = \ln 10 \times \frac{180}{2\pi} (\epsilon_L - \epsilon_R) \times c \times d \quad (\text{Formel 2})$$

c = Konzentration

d = Schichtdicke der Küvette

ϵ_L und ϵ_R = Extinktionskoeffizient für links und rechts polarisiertes Licht

Im Bereich von 170 bis 260 nm liefern die Amidgruppen im Proteinerückgrat für jede Sekundärstruktur einen spezifischen Cotton-Effekt, das heißt, dass sich die optische Drehung mit Abnahme der Wellenlänge bis zum Absorptionsmaximum zuerst in die eine Richtung und danach in die entgegengesetzte Richtung ändert. Am Absorptionsmaximum ist die optische Drehung Null. Eine Messung des CD-Spektrums ergibt immer nur die Summe aller Cotton-Effekte der jeweiligen Sekundärstrukturen. Die Anteile an α -Helix-, β -Faltblatt-, β -Schleifen und ungeordneten Strukturen können über Computerprogramme mit verschiedenen Algorithmen berechnet werden. Programme (CONTINLL, CDSTR, SELCON3 und K2D2) vergleichen das Spektrum mit Spektren von bekannten Proteinen und Peptiden (Perez-Iratxeta *et al.*, 2007).

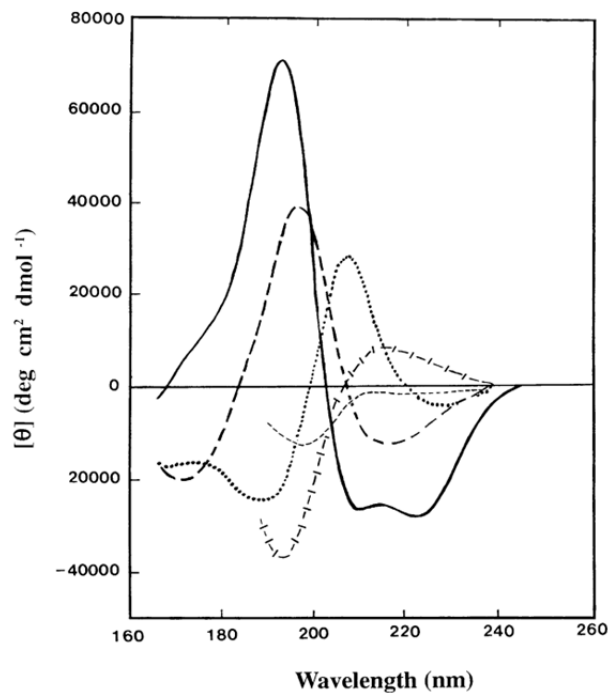


Abbildung II-1: Fern-UV CD-Spektren typischer Sekundärstrukturelemente. Dargestellt sind die Strukturen α -Helix (—), β -Faltblatt (---), β -Kehre (···), Polyprolin II Helix (-|-) und ungeordnete Strukturen (---) (Abbildung aus Kelly *et al.*, 2005)

Für die Vorhersage von Sekundärstrukturen wurde das Programm SOPMA (Self-Optimized Prediction Method with Alignment) genutzt, welches aus einer Aminosäuresequenz die Anteile der unterschiedlichen Sekundärstrukturanteile vorhersagt.

Die in dieser Arbeit erstellten Spektren wurden an dem Spektralpolarimeter J717 (Jasco Labor und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt) gemessen. Die Messung wurde in 0,5 nm Abständen mit einer Bandbreite von 2 nm bei einer Messgeschwindigkeit von 20 nm/min durchgeführt. Die Proben wurden in einer 200 μ l Durchlaufküvette (Hellma, Müllheim) mit einer Schichtdicke von 1 mm bei einer Konzentration zwischen 0,1 bis 0,3 mg/ml gemessen. Grundsätzlich wurde ein Puffer auf Basis von Kaliumphosphat gewählt, um die Absorption des Puffers möglichst niedrig zu halten.

Für die Verbesserung des Signal-Rausch Verhältnisses wurden 10 Messungen akkumuliert und gemittelt. Das gemessene Spektrum der Proteinlösung wurde um das Spektrum des Puffers korrigiert.

Für die Berechnung der Elliptizität, bezogen auf das durchschnittlichen Molekulargewichts (MWR) der Aminosäuren (*mean residue weight ellipticity*, Θ_{MWR}), wurde die Proteinkonzentration der Probe in die folgende Formel eingesetzt:

$$\Theta_{MWR} = \Theta \times 100 \times \frac{MWR}{c \times d} \quad (\text{Formel 3})$$

Θ_{MWR} = Angabe in [$^{\circ}$ * cm^2 * dmol^{-1} * Aminosäurerest $^{-1}$]

II.7 Methoden der Fluoreszenzintensität- und Fluoreszenzpolarisationsmessung

Für alle Messungen der Fluoreszenzintensität und Fluoreszenzpolarisation wurde das Fluoreszenzspektrometer LS55 (Perkin Elmer) mit der Software FL WinLab in der Version 4.00.02 verwendet. Das Gerät ist für die Fluoreszenzpolarisationsmessungen mit zwei *Fast-Filter-Accessory* Einsätzen bestückt. Dieses Zubehör ist für die Polarisation des Lichts im Anregungs- und Emissionsstrahlengang verantwortlich. Die Polarisatoren können sowohl statisch als auch dynamisch eingesetzt werden. Durch Rotation und Synchronisation mit der 50 Hz gepulsten Xenon-Lampe kann Licht abwechselnd horizontal und vertikal polarisiert werden, beziehungsweise auf der Emissionsseite in diesen Ausrichtungen gemessen werden. Für die Temperaturänderung und Temperaturkontrolle wird ein Peltierelement mit sekundärer Rückkühlung verwendet. Die Genauigkeit des Peltierelements ist angegeben mit $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ für den Bereich von 0°C bis 100°C . Durch die Verwendung des internen Magnetührers wurde eine homogene Temperaturverteilung sichergestellt.

Für alle Messungen wurde eine Quarz Suprasil Macro/Semi-micro-Küvette (Perkin Elmer, Rodgau) mit 500 μl Volumen verwendet.

II.7.1 Bestimmung der Dissoziationskonstante durch Messung der Fluoreszenzpolarisation

Mit der Fluoreszenzpolarisation kann die Beweglichkeit eines Proteins beschrieben werden. Die Beweglichkeit des Proteins ist dabei antiproportional zu dessen Größe. Als Beispiel, bewegen sich monomere Proteine schneller als komplexierte oder oligomerisierte Proteine.

Die in der Fluoreszenzpolarisation notwendige Fluoreszenzsonde wurde nach der Fluoreszenzlebenszeit des Fluorophors und der Größe des zu messenden Proteins ausgewählt. Für die Messungen von kleinen Proteinen (45 kDa) wurde in der vorliegenden Arbeit das grün fluoreszierende Protein GFP^{S65T} verwendet. Aufgrund der Fluoreszenzlebenszeit $\tau_{\text{GFP}} = 2,9 \text{ ns}$ von GFP^{S65T} (Swaminathan *et al.*, 1997) kann dieses nur für Rotationskorrelationszeiten von kleinen Proteinen benutzt werden. Im Vergleich zu kleinen Proteinen bewegen sich große Proteine im gleichen Zeitabschnitt in einem kleineren Winkelbereich und haben daher eine höhere Rotationskorrelationszeit. Um den Messbereich zu vergrößern, wird daher für größere Proteine (>50 kDa) das kovalent an das Protein gebundene Dansyl als Fluoreszenzmarker verwendet. Die Fluoreszenzlebenszeit τ_{Dansyl} liegt bei 20 ns (Takeda *et al.*, 1991) und kann dadurch die Beweglichkeit von großen Proteinen deutlicher als GFP^{S65T} darstellen. Zudem erhöht das Dansyl die Masse des zu untersuchenden Proteins nur wenig.

Im Fluoreszenzspektrometer LS55 wird die Probe mit vertikal polarisiertem Licht angeregt. Abwechselnd im Takt von 50 Hz wird die horizontal und vertikal polarisierte Emission detektiert. Aus den Intensitäten der horizontalen Polarisation I_{VH} und der vertikalen Polarisation I_{VV} wird die Fluoreszenzpolarisation in folgender Formel direkt berechnet:

$$P = \frac{I_{VV} - GF \times I_{VH}}{I_{VV} + GF \times I_{VH}} \quad (\text{Formel 4})$$

Der Korrekturfaktor GF , auch *grating factor* oder Gitterfaktor genannt, entspricht einem gerätespezifischen Faktor. Er muss für jede Wellenlänge neu ermittelt werden. Der GF kann ermittelt werden, indem die gemessene Intensität bei horizontaler Anregung und vertikaler Emission I_{HV} durch die Intensität bei horizontaler Anregung und horizontaler Emission I_{HH} geteilt wird:

$$GF = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (\text{Formel 5})$$

Für die Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_d) wurde das fluoreszenzmarkierte Protein vorgegeben und mit unterschiedlichen Konzentrationen des Bindungspartners in einem Endvolumen von 500 μ l FP Messpuffer (50 mM TRIS/HCl pH 7,5, 100 mM KCl, 0,1% (w/v) DDM, 0,002% (w/v) PMSF) im LS55 gemessen. Für die Messungen mit Ethylen und Ethylenagonisten wurde das ETR1 Protein vor der Zugabe zu AHP1-GFP^{S65T}, 15 Minuten mit 0,1 mM CuCl₂ inkubiert.

Mit der Formel von Park und Raines (2004)

$$f_B = \frac{P - P_{min}}{\Delta P} = \frac{F}{K_d + F} \quad (\text{Formel 6})$$

f_B = Fraktion an gebundenem Protein

P_{min} = Fluoreszenzpolarisation vor der Zugabe des Bindungspartners

P = Fluoreszenzpolarisation nach der Zugabe des Bindungspartners

F = Konzentration des Bindungspartners

wurden die Messwerte normalisiert. Durch Auftragung der f_B -Daten gegen die Konzentration des Bindungspartners konnte der K_d Wert aus der Funktion der Bindungskurve mit dem Programm GraFit (Version 3.0.1.0, Erithacus Software Ltd., Horley, Surrey, UK) berechnet werden. Für die Berechnung der Dissoziationskonstante wurde angenommen, dass nur eine Bindungsstelle vorliegt.

II.7.2 Bestimmung der Dissoziationskonstante durch Löschen der Tryptophanfluoreszenz (*Quenching*)

Die Aminosäure Tryptophan hat die Eigenschaft zu fluoreszieren, wenn sie mit Licht der Wellenlänge von 280 nm angeregt wird. Ist ein Tryptophan eines Proteins exponiert, kann die Fluoreszenz durch geeignete Quencher gelöscht werden. Bei dem dynamischen Quenching kann das angeregte Tryptophan die Energie strahlungslos über einen Stoß an den Quencher abgeben. Binden zwei Proteine aneinander, so kann es, falls die Tryptophane mit dem Bindungspartner in Kontakt treten, zu diesem beschriebenen Effekt kommen. Um die Konzentration und die neu eingebrachte Fluoreszenz des Bindungspartners nicht berücksichtigen zu müssen, darf der Bindungspartner keine Tryptophane besitzen.

Um die ebenfalls fluoreszierenden Tyrosine (Anregung bei 275 nm) und Phenylalanine (Anregung bei 258 nm) nicht ebenfalls anzuregen, wurde die Tryptophananregung (Anregung bei 285 nm) längerwellig gewählt (Winter & Noll, 1998). Die Anregung der Tryptophansonden erfolgte daher bei 295 nm mit einer Spaltbreite von 5 nm. Die Emission wurde zwischen 305 nm und 400 nm mit einer Spaltbreite von 10 nm und einer Geschwindigkeit von 80 nm/min gemessen.

Für jede Messung wurden 10 Scans gemittelt. Aus der Kurve kann die Wellenlänge, bei der das Maximum der Fluoreszenzintensität erhalten wird, abgelesen werden. Die Messungen wurden mit 0,2 µM gereinigtem Protein bei 20°C durchgeführt. In eine magnetisch rührbaren Quarz-Suprasil Halbmikro-Küvette wurden 450 µl der Proteinlösung in FP-Messpuffer vorgelegt und mit 50 µl Lösung mit unterschiedlichen Konzentrationen des Bindungspartners gemischt und gemessen.

In Anlehnung an die Hill Gleichung, beschreibt die Gleichung

$$\frac{F_0 - F}{F_0} = F_T \frac{[Bindungspartner]}{K_d + [Bindungspartner]} \quad (\text{Formel 7})$$

F_0 = Fluoreszenzintensität vor der Zugabe des Bindungspartners

F = Fluoreszenzintensität nach der Zugabe des Bindungspartners

F_T = Gesamtfluoreszenzintensität

$[\]$ = Konzentration des Bindungspartners

das Verhältnis der Fluoreszenzänderung gegen die Fluoreszenzintensität bei 352 nm. Durch Auftragen der Ergebnisse gegen die Konzentration des Bindungspartners in einem Diagramm, kann unter Anwendung einer Kurvenauswertung die Dissoziationskonstante K_d bestimmt werden.

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm GraFit (Version 3.0.1.0, Erithacus Software Ltd., Horley, Surrey, UK) unter der Annahme von nur einer Bindungsstelle.

II.7.3 Bestimmung des molekularen Gewichts durch den Perrin-Plot

Die molekulare Beweglichkeit von Molekülen ist abhängig von diversen Faktoren; der Gaskonstante, Viskosität des Mediums, Temperatur, Größe, Form und Masse des Moleküls. Informationen über die Größe und Form eines Proteins sind meist jedoch nicht vorhanden. Diese fehlenden Informationen können aber durch die Änderung einer der bekannten Faktoren, bei gleichzeitiger Beibehaltung der anderen Faktoren, über den Perrin Plot bestimmt werden. Dabei wird üblicherweise für ein unbekanntes Protein eine globuläre Form angenommen. Somit kann durch die Änderung der Temperatur oder der Viskosität direkt auf die Größe eines Proteins geschlossen werden (Lakowicz, 2006).

Die Proben wurden in einer 500 μl Quarz Semi-Mikroküvette mit Magnetrührer im LS55 gemessen. Der Magnetrührer mischte während der Messung die Probe, um die Temperatur gleichmäßig zu verteilen. Das an das LS55 angeschlossene Peltierelement heizte, beziehungsweise kühlte die Küvette in der Küvettenhalterung auf die eingestellte Temperatur. Die vom Hersteller angegebene Genauigkeit ist $0,1^\circ\text{C}$ im Bereich von 0°C bis 100°C . Die Messergebnisse wurden in Anisotropie angegeben. Die Viskositäten der Glycerin-Lösungen wurden aus der Tabelle in Segur und Oberstar (1951) entnommen. Die fehlenden Werte für die Viskosität wurden mit dem Programm GraFit berechnet. Hierfür wurden die Werte aus der Viskositätstabelle in ein Diagramm eingetragen, um aus der Kurvenformel die Viskosität für jede Temperatur zu bestimmen.

Im Perrin Plot wurde der Kehrwert der Anisotropie gegen den Quotienten aus Temperatur und Viskosität aufgetragen. Die Anisotropie ergibt sich aus der abgewandelten Formel für die Fluoreszenzpolarisation (siehe II.7.1)

$$r = \frac{I_{VV} - GF \times I_{VH}}{I_{VV} + 2 \times GF \times I_{VH}} \quad (\text{Formel 8})$$

Um das molekulare Gewicht M_w zu berechnen, wurden der Schnittpunkt der y-Achse und die Steigung der eingetragenen Messwerte in die folgende Formel eingesetzt:

$$M_w = \frac{\tau R}{r_0(\bar{v} + h)m} \quad (\text{Formel 9})$$

r_0 = intrinsische Anisotropie

τ = Fluoreszenzlebenszeit

m = Steigung im Perrin *Plot*

\bar{v} = spezifisches Volumen

h = Hydratation des Proteins

Für die Berechnung des molekularen Gewichts der gemessenen Proben wurden typische Werte für das spezifische Volumen von 0,73 ml/g und 0,23 ml/g Wasser pro Gramm Protein für die Hydratation der Proteins verwendet (Lakowicz, 2006).

II.8 Radioaktive Methoden

Für die Bestimmung der Kinaseaktivität wurde radioaktives γ -³²P-ATP eingesetzt. Das radioaktiv markierte ATP kann von Kinasen gebunden werden, welche die markierte γ -Phosphorylgruppe auf das Zielprotein übertragen. In einer SDS-PAGE wird das phosphorylierte Protein dann von dem restlichen ATP getrennt. In einer

Radiographie kann das markierte Protein detektiert werden. Für diese Versuche wurde das radioaktive γ -³²P-ATP mit unmarkiertem ATP gemischt und in einer Endkonzentration von 200 μ M und einer Aktivität von 0,5 Ci/mmol verwendet.

II.8.1 Nachweis der Kinaseaktivität von Proteinen mit γ -³²P-ATP

Die Proteinproben wurden entweder in Kinasepuffer C1 (50 mM HEPES/NaOH pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 10 mM MnCl₂) oder in Kinasepuffer C2 (50 mM TRIS/HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 2 mM DTT) mit ATP mit einer Aktivität von 0,5 μ Ci gemischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Kinaseaktivität wurde durch Zugabe von 17 μ l SDS-Probenpuffer gestoppt. 20 μ l Probe wurden mittels SDS-PAGE bei 35 mA aufgetrennt und die Proteinbanden anschließend in einem Westernbot auf eine Nitrocellulosemembran (lösliche Proteine) oder PVDF-Membran (Membranproteine) übertragen. Die Radiographie erfolgte durch das Speicherfoliensystem BAS, indem die Membran in Plastikfolie eingeschlagen auf eine *Phosphor-Imaging* Platte gelegt wurde. Die in der Platte gebundenen photostimulierbaren BaFBr:Eu²⁺-Phosphorkristalle wurden durch die Radioaktivität aktiviert und konnten anschließend im FLA 3000 ausgelesen und digitalisiert werden (Amemiya & Miyahara, 1988). Als Kontrolle für die korrekte Proteinübertragung erfolgte eine Ponceau-Färbung wie unter II.5.5 beschrieben.

III Ergebnisse

Zielsetzung dieser Arbeit war die Charakterisierung der Bindung zwischen ETR1 und seinen Interaktionspartnern, die an der Signaltransduktion partizipieren. Als direkte Interaktionspartner für den Ethylenrezeptor ETR1 gelten RTE1, AHP1, CTR1 und EIN2. Mit Ausnahme von EIN2 ist die in der Literatur beschriebenen Interaktionen dieser Proteine mit ETR1 entweder durch genetische- oder durch Hefe-Zwei-Hybrid Studien gefunden worden (Resnick *et al.*, 2006, Urao *et al.*, 2000, Clark *et al.*, 1998). Eine Charakterisierung oder Quantifizierung war mit diesen Methoden nicht möglich, da mit ihnen zwar die Bindung aber keine Dissoziationskonstanten bestimmt werden konnte. Um die Protein-Protein Wechselwirkung charakterisieren zu können, wurden in dieser Arbeit Tryptophanfluoreszenz- und Fluoreszenzpolarisations-Methoden verwendet, die in der Lage sind, diese Interaktionen zu quantifizieren.

Eine hohe Reinheit der Proteine und die korrekte Faltung waren essentiell für die korrekte Durchführung der äußerst sensitiven Methoden. Es musste ausgeschlossen werden, dass Interaktionen durch Fremdproteine zustande kommen oder falsch-negative Ergebnisse durch denaturiertes Protein entstehen. Daher mussten für diese biochemischen Untersuchungen die Protokolle zur Proteinexpression und nativen Reinigung optimiert werden.

III.1 Quantifizierung der Interaktion zwischen ETR1 und RTE1

III.1.1 Denaturierende Reinigung von ETR1 durch IMAC

Für die Interaktionsstudien wurde ETR1 unter denaturierenden Bedingungen (vgl. II.4.2) gereinigt und wie unter II.4.2.1 beschrieben renaturiert. Die Funktionalität von ETR1 wurde in CD-spektroskopischen Messungen und durch Messung der Kinaseaktivität in Voet van Vormizeele und Groth (2008) nachgewiesen.

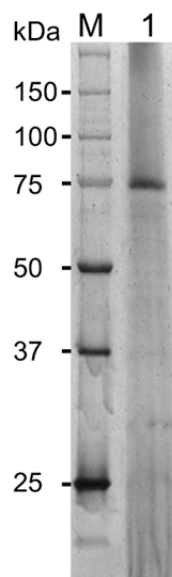


Abbildung III-1: Silbergefärbtes SDS-Polyacrylamidgel mit gereinigtem ETR1 Protein. Spur 1 enthält 2 µg renaturiertes ETR1, aufgetrennt in einem 10%igen Trenngel. M = Proteingrößenstandard „Precision Plus Protein Dual Color Standard“.

Abbildung III-1 zeigt ein silbergefärbtes SDS-Polyacrylamidgel von nach dem in II.4.2 beschriebenen Protokoll gereinigten ETR1. In Spur 1 ist eine deutliche Proteinbande zu erkennen, für die aus der Laufstrecke ein Molekulargewicht von 74,7 kDa bestimmt wurde. Diese Bande konnte dem ETR1 Protein (84,9 kDa) zugeordnet werden.

III.1.2 Native Reinigung von RTE1 und RTE1^{C161Y} durch IMAC

Die Proteine RTE1 und RTE1^{C161Y} wurden wie unter II.4.4 beschrieben gereinigt. Um die Reinheit zu untersuchen, wurde eine SDS-PAGE (II.5.3) durchgeführt, die in Abbildung III-2 dargestellt ist.

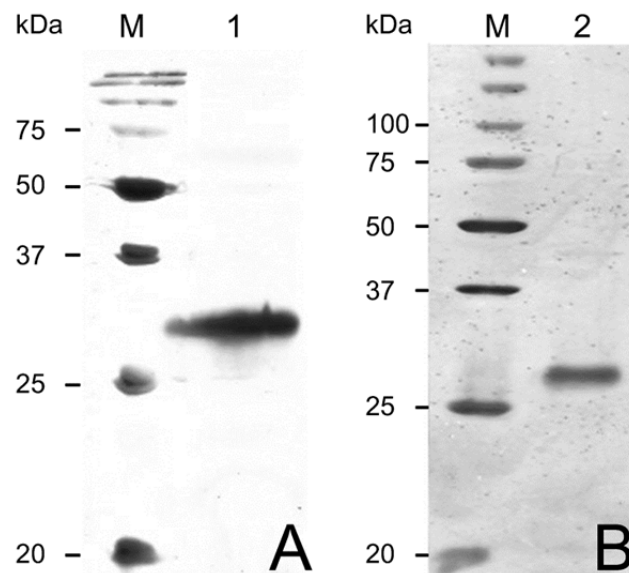


Abbildung III-2A/B: Silbergefärbtes SDS-Polyacrylamidgel mit gereinigtem RTE1 und RTE1^{C161Y} Protein. A: In Spur 1 wurden 2 µg RTE1 in einem 15%igem Trenngel aufgetrennt. B: In Spur 2 wurden 2 µg RTE1^{C161Y} in einem 12%igem Trenngel aufgetrennt. M = Proteingrößenstandard „Precision Plus Protein Dual Color Standard“.

Abbildung III-2 A zeigt die Auftrennung von gereinigtem RTE1 Protein. Die Größe des Proteins im 15%igen SDS-Polyacrylamidgel beträgt 32,7 kDa. In Abbildung III-2 B ist das mutierte Protein RTE1^{C161Y} aufgetrennt worden. Das RTE1^{C161Y} Protein zeigt im 12%igen SDS-Polyacrylamidgel eine Größe von 29,3 kDa mit einer hohen Reinheit. Beide Proteinproben zeigen eine Bande, die aufgrund ihrer Größe RTE1 (27,9 kDa, inklusive N-terminalem His-Tag) zugeordnet werden kann.

III.1.3 Strukturelle Untersuchung von RTE1 und RTE1^{C161Y} mittels CD-Spektroskopie

Mit Hilfe dieser Methode kann der Faltungszustand von Proteinen beurteilt und der Anteil an Sekundärstrukturen bestimmt werden. Der Gehalt an Sekundärstrukturen dient als Hinweis für die korrekte Faltung des Proteins. Um die Sekundärstrukturanteile des RTE1 Proteins abschätzen zu können, wurden die Sekundärstrukturanteile mit dem Programm SOPMA aus der Proteinsequenz vorhergesagt.

Vor der Messung wurden die gereinigten Proteine RTE1 und RTE1^{C161Y} in einen Messpuffer (10 mM Kaliumphosphat pH 7,5, 100 mM KCl) umgepuffert. Die Proteinkonzentration wurde spektroskopisch nach Bradford (II.4.2) bestimmt und für die Messung auf 0,2 mg/ml eingestellt. Die CD-spektroskopische Messung erfolgte wie unter II.6.4 beschrieben.

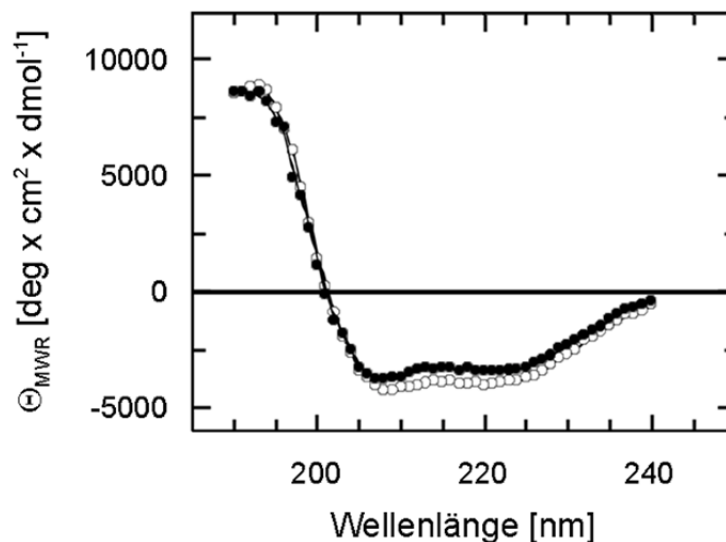


Abbildung III-3: Circulardichroismus-Spektroskopie der Proteine RTE1 und der Mutante RTE1^{C161Y}. Eine RTE1 Lösung mit einer Konzentration von 0,2 mg/ml wurde zehnmal von 240 nm bis 190 nm in 0,5 nm Schritten und einer Bandbreite von 2 nm gemessen, akkumuliert und um das Pufferspektrum korrigiert. Die Werte des CD-Spektrums von RTE1 (●) und RTE1^{C161Y} (○) wurden für eine bessere Vergleichbarkeit auf die Elliptizität der mittleren Aminosäuremolmasse (Θ_{MWR}) genormt.

Die normierten Spektren (vgl. II.6.4) der Proteine RTE1 und RTE1^{C161Y} sind in Abbildung III-3 dargestellt. Deutlich zu erkennen ist, dass in beiden Spektren α/β -Sekundärstrukturen vorhanden sind. Der Nulldurchgang bei 201 nm ist für beide Proteine identisch. Beide Proteine zeigen Minima bei 209 nm und 220 nm. Zu typischen α -helikalen Spektren können Minima bei 208 nm und 222 nm zugeordnet werden, während ein Minimum von 215 nm in typischen β -Faltblatt-Spektren bestimmend ist. Die für die RTE1 Proteine gemessenen Spektren sind um ein bis zwei Nanometer verschoben. Aufgrund der Bandbreite von 2 nm lassen sich die Minima aber nicht exakt bestimmen.

Tabelle III-1: Berechnete und vorhergesagte Sekundärstrukturanteile in RTE1 und RTE1^{C161Y}

| Programm | Protein | α -Helix | β -Faltblatt | β -Kehre | ungeordnet |
|----------|-----------------------|-----------------|--------------------|----------------|------------|
| CONTINLL | RTE1 | 18% | 28% | 21% | 33% |
| | RTE1 ^{C161Y} | 18% | 30% | 21% | 30% |
| SOPMA | RTE1 | 29% | 23% | 6% | 41% |
| | RTE1 ^{C161Y} | 29% | 23% | 6% | 41% |

Die quantitativen Anteile der Sekundärstrukturen wurden mit dem Programm CONTINLL berechnet (Sreerama & Woody, 2000). Eine Vorhersage der Sekundärstrukturanteile aus der primären Aminosäuresequenz wurde mit dem Programm SOPMA durchgeführt. Die Ergebnisse der Berechnung der Anteile der Sekundärstruktur sind in Tabelle III-1 gezeigt. Die vorhergesagten Werte für den α -Helix Anteil sind 11% höher als die gemessenen Werte. Gleichzeitig sind die Anteile für β -Faltblatt Strukturen und β -Kehre um 5-7% beziehungsweise 15% niedriger. Der Anteil an nicht geordneten Strukturen ist in der Vorhersage zwischen 9 und 11% höher.

III.1.4 Bestimmung der Dissoziationskonstante des ETR1 – RTE1- und ETR1 – RTE1^{C161Y}-Komplexes

Für diesen Versuch wurde tryptophanfreies ETR1 verwendet. In der tryptophanfreien ETR1 Variante wurden die sieben Tryptophane durch Leucin oder Phenylalanin ausgetauscht: W11L, W53F, W74F, W181L, W265L, W288L, W563L (Bisson *et al.*, 2009).

Die Messung der Dissoziationskonstante des ETR1 - RTE1 Komplex erfolgte wie in II.7.2 beschrieben. Für jede Messung wurden 200 nM RTE1 Protein in 450 μ l Messpuffer (30 mM TRIS/HCl pH 7,5, 180 mM NaCl, 10 mM KCl, 0,05% (w/v) FOSCHOLINE 15, 0,1% (w/v) DDM) vorgelegt und die Tryptophanfluoreszenz nach Zugabe von 50 μ l ETR1 (50 mM TRIS/HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 0,1% (w/v) DDM) gemessen. Die maximale Fluoreszenzintensität wurde bei 352 nm gemessen.

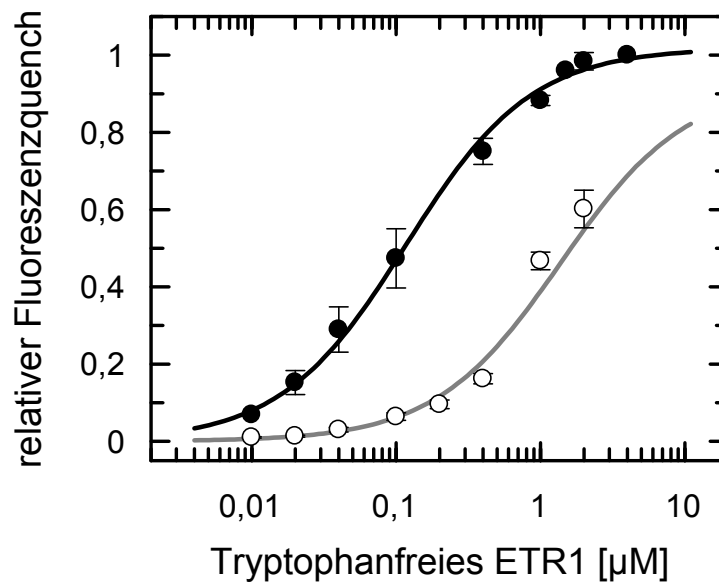


Abbildung III-4: Tryptophanfluoreszenzquench in Abhängigkeit der Konzentration an tryptophanfreiem ETR1. Für die Komplexbildung von ETR1 mit RTE1 (●) wurde eine Dissoziationskonstante von $117 \text{ nM} \pm 9 \text{ nM}$ berechnet. Der K_d des ETR1 - RTE1^{C161Y}-Komplex (○) wurde mit $1,38 \text{ } \mu\text{M} \pm 0,62 \text{ } \mu\text{M}$ bestimmt. Die Messpunkte wurden dreifach bestimmt.

In je 3 unabhängigen Messungen wurden die Fluoreszenzintensitäten bei 352 nm des Puffers, von RTE1 und der Gesamtfluoreszenzintensität von RTE1 mit ETR1 gemessen. Die Daten wurden gemittelt, normiert und sind in Abbildung III-4 dargestellt.

Abbildung III-4 zeigt die ausgewerteten Ergebnisse der Interaktion von ETR1 und RTE1 beziehungsweise RTE1^{C161Y}. In der logarithmischen Auftragung des Fluoreszenzintensitätsverhältnisses gegen die ETR1 Konzentration, sind die sigmoiden Kurven der Auswertung (vgl. II.7.2) zu sehen. Für RTE1 ergibt sich ein K_d Wert von $117 \text{ nM} \pm 9 \text{ nM}$. Die Auswertung der Kurve von ETR1 und RTE1^{C161Y} zeigt einen etwa 12-fach höheren K_d Wert von $1,38 \text{ } \mu\text{M} \pm 0,62 \text{ } \mu\text{M}$.

III.2 Charakterisierung und Quantifizierung der Interaktion zwischen ETR1 und AHP1

Die Interaktion zwischen ETR1 und AHP1 wurde erstmals von Urao *et al.* im Jahr 2000 in Hefe-Zwei-Hybrid Studien beschrieben. Diese Interaktion sollte durch Bestimmung der Komplexbildungskonstante mittels Fluoreszenzpolarisation quantifiziert werden. Für die Charakterisierung der Bindung in Abhängigkeit des Phosphorylierungsstatus wurden Mutanten, der für den Phosphotransfer wichtigen Aminosäuren Histidin und Aspartat erstellt und die Bindung der gereinigten rekombinanten Proteine durch Fluoreszenzpolarisation bestimmt. Durch Mutation des konservierten Histidinrests (H79) in AHP1 und des konservierten Aspartatrests (D659) in der Empfängerdomäne in ETR1 zu Glutamat beziehungsweise zu Alanin sollte eine Phosphorylierung imitiert beziehungsweise unterdrückt werden.

Die Substitution des kanonischen Histidinrests in der Kinasedomäne soll eine Phosphorylierung imitieren und damit zeigen, dass die Signalübertragung über das Zwei-Komponentensystem eine funktionelle Rolle im Ethylensignalweg spielt.

III.2.1 Native Reinigung von AHP1, AHP1-GFP^{S65T}, AHP1^{H79A}-GFP^{S65T} und AHP1^{H79E}-GFP^{S65T} durch IMAC

Die Proteine wurden wie unter II.3.3 beschrieben exprimiert und gereinigt. Mit einer SDS-PAGE (Abbildung III-5) wurde die Reinheit der Proteinproben untersucht.

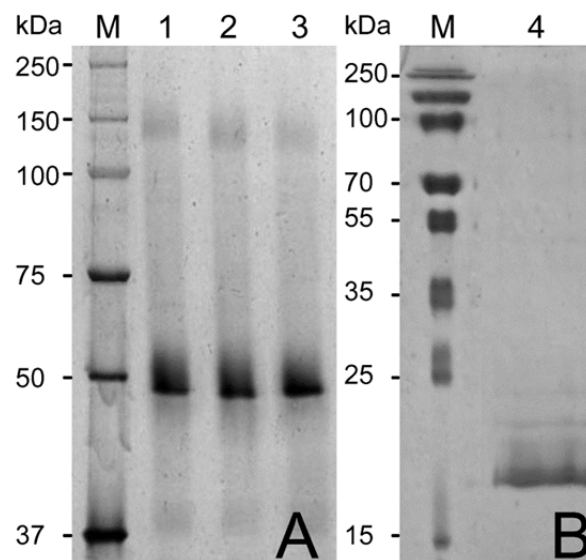


Abbildung III-5: Auftrennung von gereinigtem AHP1, AHP1-GFP^{S65T}, AHP1^{H79A}-GFP^{S65T} und AHP1^{H79E}-GFP^{S65T} in einem 15%igen silbergefärbten SDS-Polyacrylamidgel. A: In jeder Spur wurden 2 µg aufgetragen. Spur 1 = AHP1-GFP^{S65T}, Spur 2 = AHP1^{H79A}-GFP^{S65T}, Spur 3 = AHP1^{H79E}-GFP^{S65T}, M = Proteingrößenstandard „Precision Plus Protein Dual Color Standard“. B: In Spur 4 wurden 2 µg AHP1 aufgetragen. M = Proteingrößenstandard „PageRuler Plus Prestained Protein Ladder“.

In Abbildung III-5A sind die Proteine AHP1-GFP^{S65T}, AHP1^{H79A}-GFP^{S65T} und AHP1^{H79E}-GFP^{S65T} als deutliche Bande auf dem SDS-Polyacrylamidgel zu erkennen. Die drei untersuchten Proteine zeigen auf dem SDS-Polyacrylamidgel eine Größe

von 49,7 kDa, was dem AHP1-GFP^{S65T} Monomer von 44,6 kDa entspricht. Weiterhin zeigt das SDS-Polyacrylamidgel schwache Banden bei 37 kDa und 150 kDa. Abbildung III-5B zeigt die Auftrennung von AHP1 in einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel. Eine deutliche Bande bei 18,1 kDa kann dem AHP1-Monomer von 18,5 kDa zugeordnet werden.

III.2.2 Untersuchung der Sekundärstruktur von AHP1

Für die Bestimmung der Sekundärstrukturanteile von gereinigtem AHP1, wurde eine AHP1 Lösung (10 mM Kaliumphosphatpuffer, 6% Glycerin) auf 52,3 µg/ml verdünnt und wie unter II.4.4 beschrieben spektralphotometrisch von 240 nm bis 190 nm bei Raumtemperatur gemessen.

Die Elliptizität wurde auf das durchschnittliche Molekulargewicht der Aminosäuren normiert. Die Dekonvolution der Sekundärstrukturanteile erfolgte mit dem Programm CONTINLL. Die Anteile der Sekundärstrukturen wurden mit den aus der Sequenz mit dem Programm SOPMA berechneten Anteilen verglichen.

Das Spektrum in Abbildung III-6 zeigt deutlich, dass klare Sekundärstrukturen vorhanden sind. Der Nulldurchgang liegt bei 201 nm und die Minima befinden sich bei 209 und 220 nm. Im Gegensatz zu den für α -helikale- und β -Faltblattstrukturen typischen Minima liegen die Minima für AHP1 wie im Fall RTE1 um ein bis zwei nm verschoben. Das Spektrum zeigt einen stärker ausgeprägten Cotton-Effekt, der für einen höheren Anteil an α -helikalen Strukturen im Vergleich zu RTE1 spricht.

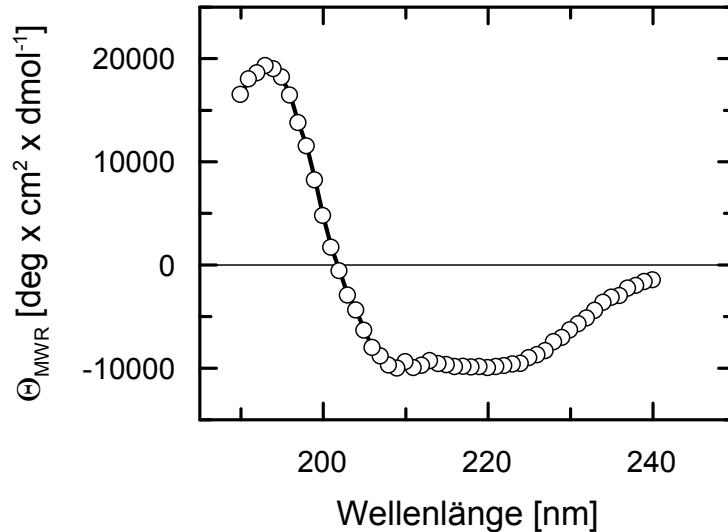


Abbildung III-6: CD-Spektrum von AHP1. Eine Lösung von 0,052 mg/ml AHP1 wurde zehnmal von 240 nm bis 190 nm in 0,5 nm Abständen und einer Bandbreite von 2 nm gemessen und die Werte gemittelt. Das gezeigte Spektrum wurde um das Spektrum des Puffers korrigiert. Die Werte aus der Messung der Elliptizität wurden auf die mittlere Aminosäuremolmasse (Θ_{MWR}) normiert (II.4.4).

Tabelle III-2: Vergleich von berechneten und vorhergesagten Sekundärstrukturanteilen in AHP1.

| Programm | Protein | α -Helix | β -Faltblatt | β -Kehre | Random Coil |
|----------|---------|-----------------|--------------------|----------------|-------------|
| CONTINLL | AHP1 | 59,9% | 4,2% | 13% | 22,9% |
| SELCON3 | AHP1 | 61,9% | 5,5% | 11,9% | 22,1% |
| SOPMA | AHP1 | 77,3% | 2,6% | 3,9% | 16,2% |

Sowohl die Dekonvolution des Spektrums mit den Programmen CONTINLL und SOLCON3 als auch die Vorhersage mit dem Programm SOPMA ist in Tabelle III-2 gezeigt. Die Vorhersage der Sekundärstrukturen mit SOPMA sagt einen hohen Anteil an α -helikalen- und geringe Anteile an β -Strukturen voraus. Im Vergleich mit den in der CD-Spektroskopie bestimmten Sekundärstrukturanteilen, berechnen die Programme CONTINLL und SELCON3 ebenfalls einen hohen Anteil an α -helikalen Strukturen und einen vergleichbar geringen Anteil an β -Faltblattstrukturen. Der Anteil an α -Helices ist in der Dekonvolution um etwa 16% niedriger, während der

Anteil an β -Kehren und Random Coil Strukturen um 6-8% höher als in der Vorhersage ist.

III.2.3 Bestimmung der Dissoziationskonstante des ETR1 – AHP1-GFP^{S65T} Komplexes

In Hefe-Zwei-Hybrid Versuchen konnte die Interaktion zwischen ETR1 und AHP1 nachgewiesen werden (Urao *et al.*, 2000). Eine Quantifizierung dieser Bindung fehlte bisher. Da die beiden benötigten Proteine in rekombinanter Form in ausreichender Reinheit vorlagen, sollte mit Fluoreszenzpolarisationsmessungen die Dissoziationskonstante (K_d) für die Interaktion bestimmt werden.

Die Bestimmung der Dissoziationskonstante erfolgte wie in II.7.1 beschrieben. Es wurden 8 nM AHP1-GFP^{S65T} in FP Messpuffer in einer Quarz Semi-Mikro Küvette vorgelegt und ETR1 in unterschiedlichen Konzentrationen zwischen 0,04 μ M und 20 μ M hinzugegeben. Diese sind in Abbildung III-7 eingefügt.

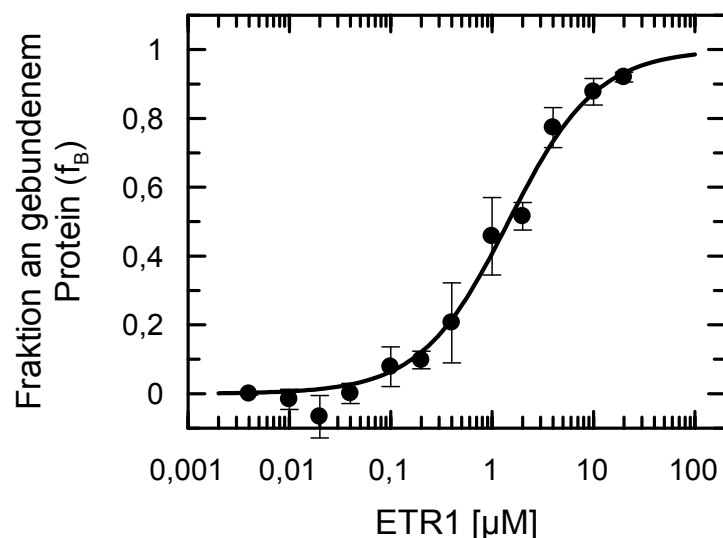


Abbildung III-7: Änderung der Fluoreszenzpolarisation in Abhängigkeit der ETR1 Konzentration. Die AHP1-GFP^{S65T} Konzentration beträgt 8 nM (●). Die Dissoziationskonstante K_d ist $1,43 \mu\text{M} \pm 0,29 \mu\text{M}$. Jeder Messpunkt wurde aus drei bis fünf unabhängigen Messungen gemittelt.

In Abbildung III-7 ist die Kurve für die Interaktion zwischen ETR1 und AHP1-GFP^{S65T} zu erkennen. Die Bestimmung der Dissoziationskonstante erfolgte mit dem Programm GraFit und ergab für den ETR1 - AHP1-GFP^{S65T}-Komplex einen K_d -Wert von $1,4 \mu\text{M} \pm 0,29 \mu\text{M}$.

III.2.4 Bestimmung der Dissoziationskonstante des ETR1-AHP1^{H79A}-GFP^{S65T} und ETR1-AHP1^{H79E}-GFP^{S65T} Komplexes

Zur Klärung der Frage, ob der Phosphorylierungsstatus der Proteine einen Einfluss auf die Komplexbildung hat, wurden die konservierten phosphatübertragenden Aminosäurereste in den beiden Proteinen mutiert. In AHP1 wurde Histidin-79 für die Simulation der phosphorylierten Form durch Glutamat und für die nicht phosphorylierte Variante durch Alanin substituiert. Auf gleiche Weise wurde das phosphatübertragende Aspartat-659 in der Empfängerdomäne von ETR1 durch Alanin beziehungsweise durch Glutamat substituiert. Für die so mutierten Proteine wurden die Dissoziationskonstanten in den vier möglichen Kombinationen wie unter II.7.1 beschrieben bestimmt. Um die Messungen mit den wildtypischen Proteinen und untereinander vergleichen zu können, wurden in allen Versuchen 8 nM der jeweiligen AHP1-GFP^{S65T} Mutante in 500 μl FP Messpuffer eingesetzt.

Die ETR1 Mutanten wurden wie in III.2.3 kumulativ zu der Probe gegeben und die Änderung der Fluoreszenzpolarisation ermittelt. Um die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können, wurden die Messwerte mit der in II.7.1 beschriebenen Formel normalisiert. Die ausgewerteten Bindungskurven sind in Abbildung III-8 dargestellt.

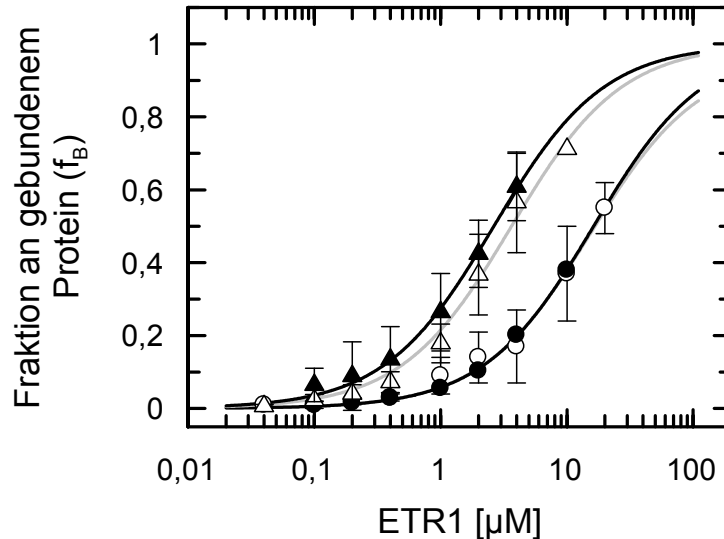


Abbildung III-8: Änderung der Fluoreszenzpolarisation von AHP1-GFP^{S65T} und den Mutanten H79A und H79E in Abhängigkeit der Konzentration von ETR1 beziehungsweise ETR1^{D659A} oder ETR1^{D659E} Konzentration. Für die einzelnen Kombinationen ergeben sich folgende K_d -Werte: ETR1^{D659E} - AHP1^{H79E}-GFP^{S65T} $16,3 \mu\text{M} \pm 1,7 \mu\text{M}$ (●), ETR1^{D659A} - AHP1^{H79A}-GFP^{S65T} $15,4 \mu\text{M} \pm 3,3 \mu\text{M}$ (○), ETR1^{D659E} - AHP1^{H79A}-GFP^{S65T} $2,6 \mu\text{M} \pm 0,4 \mu\text{M}$ (▲) und ETR1^{D659A} - AHP1^{H79E}-GFP^{S65T} $3,6 \mu\text{M} \pm 0,6 \mu\text{M}$ (△). Jeder Messpunkt wurde aus drei bis fünf unabhängigen Messungen gemittelt.

Die Messkurven der Kombinationen von ETR1^{D659E} mit AHP1^{H79A}-GFP^{S65T}, beziehungsweise ETR1^{D659A} mit AHP1^{H79E}-GFP^{S65T} liegen mit einem K_d von $2,6 \mu\text{M} \pm 0,4 \mu\text{M}$ beziehungsweise $3,6 \mu\text{M} \pm 0,6 \mu\text{M}$ Werten, in der Nähe des K_d -Werts des ETR1 - AHP1 Komplexes. Die beiden Bindungskurven von ETR1^{D659E} mit AHP1^{H79E}-GFP^{S65T} und ETR1^{D659A} mit AHP1^{H79A}-GFP^{S65T} zeigen einen K_d -Wert von $16,3 \mu\text{M} \pm 1,7 \mu\text{M}$ beziehungsweise von $15,4 \mu\text{M} \pm 3,3 \mu\text{M}$. Dies entspricht einer etwa 11-fach höheren Bindungskonstante im Vergleich zu dem ETR1 - AHP1 Komplex.

III.2.5 Wirkung von Agonisten auf die Komplexbildung von ETR1 und AHP1-GFP^{S65T}

Um die Frage zu klären, ob und in welchem Umfang Ethylen die ETR1 – AHP1-GFP^{S65T} Interaktion beeinflusst, sollte in Fluoreszenzpolarisationsversuchen die Dissoziationskonstante in Anwesenheit von Ethylen bestimmt werden.

Für die *in vitro*-Versuche des ETR1 – AHP1 Komplex in Anwesenheit von Ethylen, wurde aufgrund der schlechten Löslichkeit von Ethylen in Wasser und der schlechten Bestimmbarkeit von der gelösten Menge an Ethylen, die Chemikalie Ethephon (2-Chlor-ethylphosphonsäure; vgl. Abbildung III-9) verwendet.

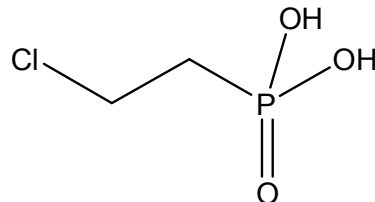


Abbildung III-9: Struktur von Ethephon (2-Chlor-ethylphosphonsäure).

In wässriger Lösung wird Phosphonsäurechlorid eliminiert, das dann zu Phosphat und Chlorid hydrolysiert wird, und so Ethylen *in situ* freisetzt. Aufgrund der pH-Wertänderung durch entstehende Phosphorsäure wurde das Ethephon in 1M TRIS/HCl pH 7,5 angesetzt, um den pH Wert zu stabilisieren.

Als Alternative zu Ethephon wurde in einem zweiten Ansatz der Ethylenagonist Kaliumcyanid (KCN) verwendet, für den in Versuchen mit radioaktiv markiertem Cyanid beschrieben wurde, dass er als Ethylenanalogon für ETR1 sowohl als strukturelles als auch als funktionelles Äquivalent fungieren kann (Bisson & Groth, 2012). Für die Bindung von Ethylen ist bekannt, dass Kupfer als Kofaktor von ETR1 gebunden sein muss (Rodríguez *et al.*, 1999). Daher wurden die ETR1 Proben für die Bindungsversuche von Ethylen beziehungsweise KCN mit Kupferchlorid versetzt.

Die Durchführung der Versuche erfolgte wie unter II.6.1 beschrieben. Die Messung erfolgte nach kumulativer Zugabe von ETR1 in FP Messpuffer. Als Kontrollversuch diente eine Messung ohne den Kofaktor CuCl_2 , wodurch die Bindung von Ethylen oder KCN verhindert wurde.

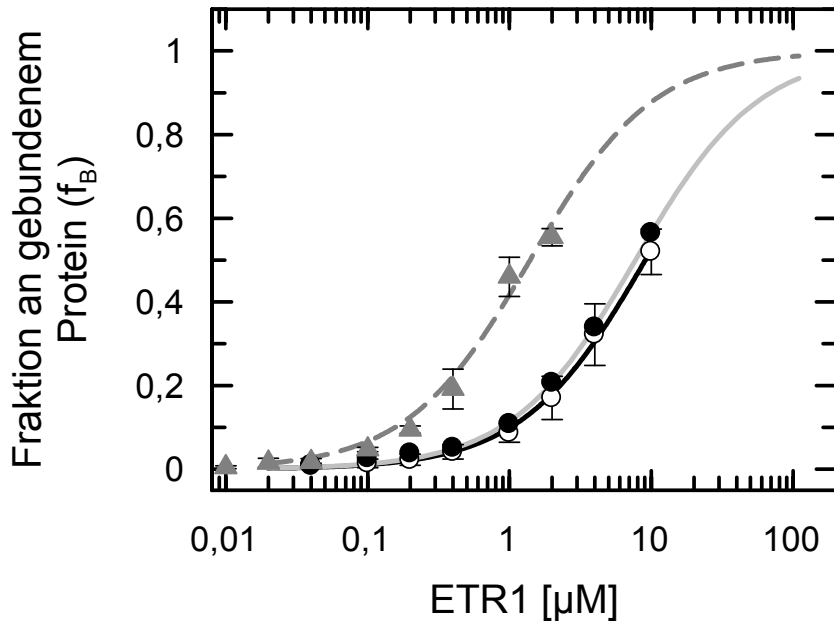


Abbildung III-10: Bindungskurven von ETR1 und AHP1-GFP^{S65T} in Abhängigkeit von Ethylen und dem Ethylenagonisten KCN. Die Messung der Bindung in Anwesenheit von 100 µM Ethephon (●)(—), entspricht einem K_d von $7,7 \mu\text{M} \pm 0,7 \mu\text{M}$. Die Messung der Bindung in Anwesenheit von 100 µM KCN (○) (—) entspricht einem K_d von $9,1 \mu\text{M} \pm 1,0 \mu\text{M}$. Kontrollmessung der Bindung ohne den essentiellen Kofaktor Kupfer (▲). Die gestrichelte Linie (---) repräsentiert die Bindung von ETR1 – AHP1-GFP^{S65T} mit $1,4 \mu\text{M}$, wie in Abbildung III-4 gezeigt. Jeder Messpunkt wurde aus drei bis fünf unabhängigen Messungen gemittelt.

In Abbildung III-10 zeigt die graue unterbrochene Linie eine Kurve mit einem K_d von $1,4 \mu\text{M}$. Diese Kurve repräsentiert das Ergebnis der Interaktionsmessung zwischen ETR1 und AHP1-GFP^{S65T} (siehe III.2.3). In der Messung mit 100 µM Ethephon konnte für die ETR1 – AHP1-GFP^{S65T} Interaktion ein K_d -Wert von $7,7 \mu\text{M} \pm 0,7 \mu\text{M}$ bestimmt werden. Einen K_d -Wert von $9 \mu\text{M} \pm 1,0 \mu\text{M}$ konnte bei der Verwendung von 100 µM KCN für die ETR1 – AHP1 Bindung bestimmt werden.

In Abbildung III-10 zeigen die grauen Dreiecke die Ergebnisse der Kontrollmessung von ETR1 und AHP1-GFP^{S65T} mit 100 µM Ethephon, ohne CuCl₂. Die in Anwesenheit des Kofaktors Kupfer bestimmten K_d -Werte sind fünf- bis sechsfach höher als in der Kontrollmessung ohne Kupfer beziehungsweise ohne Kupfer und ohne Agonisten.

III.2.6 Bestimmung der molekularen Größe von AHP1-GFP^{S65T}

Für die Bestimmung der Größe von AHP1-GFP^{S65T} in Lösung wurde die Anisotropie bei unterschiedlichen Temperaturen und Viskositäten des Lösungsmittels gemessen. Für die Bestimmung wurden je 20 nM AHP1-GFP^{S65T} in FP Messpuffer gegeben und die Anisotropie wie unter II.6.3 beschrieben bei unterschiedlichen Temperaturen bestimmt. Die Messwerte wurden gegen die Temperatur und die Viskosität des Puffers im Perrin Plot aufgetragen, um aus der Steigung und dem Schnittpunkt der y-Achse das Molekulargewicht zu berechnen.

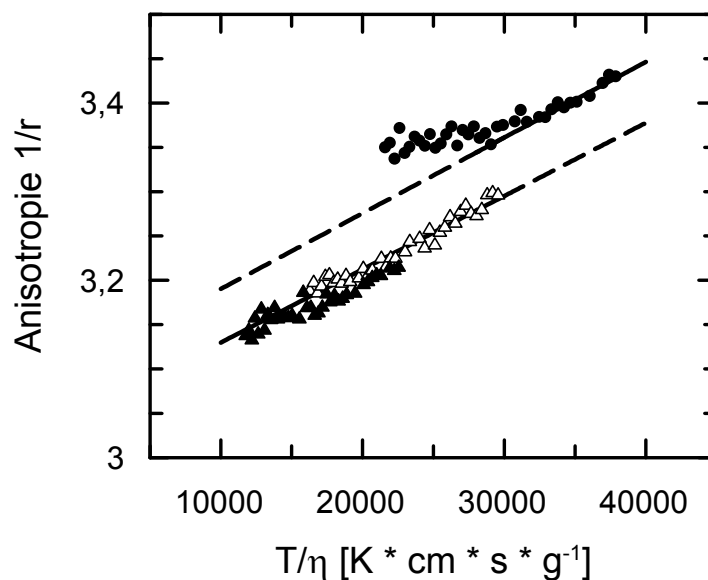


Abbildung III-11: Auftragung der reziproken Anisotropieänderung ($1/r$) von AHP1-GFP^{S65T} in Abhängigkeit der Temperatur (T) und Viskosität (η) im Perrin Plot. Die Messung von 20 nM AHP1-GFP^{S65T} erfolgte in FP Messpuffer ohne Glycerin (●) mit 10% Glycerin (Δ) und mit 20% Glycerin (\blacktriangle) bei unterschiedlichen Temperaturen.

Abbildung III-11 zeigt die Anisotropieänderung von AHP1-GFP^{S65T} für unterschiedliche Viskositäten bei verschiedenen Temperaturen. Aus der Messung der Anisotropie konnte für 10% und 20% Glycerin dieselbe Steigung bestimmt werden. Die Messwerte von AHP1-GFP^{S65T} in FP Messpuffer ohne Glycerin zeigen bei Temperaturen unter 17°C eine Abweichung vom linearen Verlauf. Für die Messpunkte über 17°C konnte die gleiche Steigung wie für 10% und 20% Glycerin

bestimmt werden. Für die Berechnung der AHP1-GFP^{S65T} Größe in FP Messpuffer ohne Glycerin wurden nur die Werte über 17°C berücksichtigt. Mit der in II.7.3 angegebenen Formel berechnet sich für AHP1-GFP^{S65T} eine Größe von $89,9 \pm 1,4$ kDa. Im Vergleich zu dem molekularen Gewicht eines AHP1-GFP^{S65T} Monomers von 45,6 kDa ergibt sich, dass AHP1-GFP^{S65T} unter den gegebenen Bedingungen als Dimer vorliegt.

III.2.7 Bestimmung der molekularen Masse des ETR1-AHP1

Komplexes

Um die Frage zu klären, in welchem stöchiometrischen Verhältnis AHP1 an ETR1 bindet, wurde die Anisotropie dieser Proteine bei unterschiedlichen Temperaturen in unterschiedlichen Glycerin-Konzentrationen gemessen. Um die Fluoreszenzintensität des dansylierten Proteins zu erhöhen, wurde β -Cyclodextrin verwendet (Kinoshita *et al.*, 1974). Über die Auftragung der Ergebnisse in den Perrin Plot sollte die Auswertung der Komplexgröße und des stöchiometrischen Verhältnisses erfolgen. In Einzelmessungen von ETR1 und AHP1 wurde die Größe der beiden Proteine ermittelt, bevor der ETR1 – AHP1 Komplex gemessen wurde.

Aufgrund des schlechten Verhältnisses der Fluoreszenzlebenszeit von GFP^{S65T} ($\tau = 2,9$ ns) zur Rotationskorrelationszeit von großen Proteine wurden die Proteine für diese Versuche mit Dansylchlorid ($\tau = 20$ ns) markiert (II.5.7). Die verwendeten Proteine hatten typischerweise ein Protein zu Dansyl Verhältnis von 1:4.

Die Bestimmung der Stöchiometrie erfolgte nach der Auswertung der Daten durch die unter II.6.3 beschriebenen Formel. In der Messung des ETR1 - AHP1 Komplex wurden $0,2 \mu\text{M}$ dansyliertes AHP1 und $2 \mu\text{M}$ ETR1 eingesetzt.

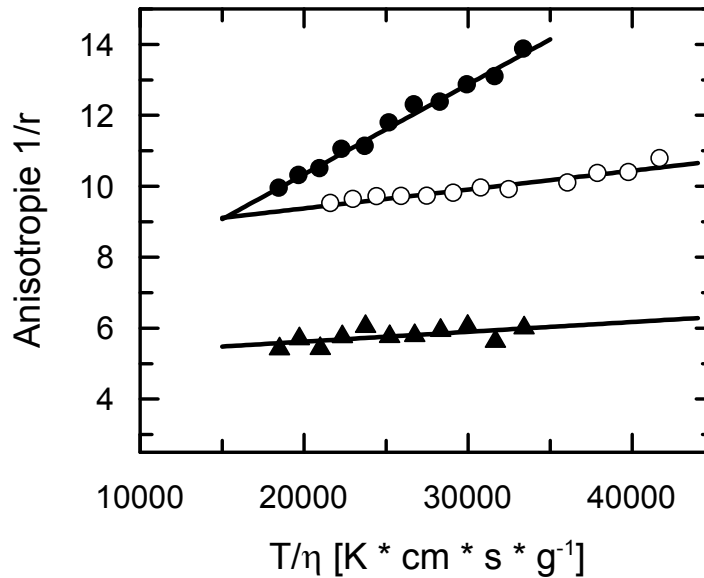


Abbildung III-12: Auftragung der Anisotropieänderung von ETR1, AHP1 und dem ETR1 – AHP1 Komplex in Abhängigkeit der Temperatur und Viskosität im Perrin Plot. Messung von 0,2 μM dansyliertem AHP1 (●), von 2 μM dansyliertem ETR1 (○) und dem Komplex von 2 μM ETR1 mit 0,2 μM dansyliertem AHP1 (▲) in Messpuffer (0,2 M Kaliumphosphat pH 8,0, 0,05% (w/v) DDM, 10 mM β -Cyclodextrin, 10% (v/v) Glycerin).

In Abbildung III-12 sind die Ergebnisse der Messung von dansyliertem AHP1, dansyliertem ETR1 und dem Komplex von ETR1 mit dansyliertem AHP1 gezeigt. Die Messwerte von AHP1 zeigen eine starke Steigung bei einer Erhöhung der Temperatur, während die Steigung für ETR1 nur leicht ausgeprägt ist. Aus den Messwerten ergibt sich für AHP1 eine berechnete Größe von 41 ± 5 kDa, für ETR1 282 ± 21 kDa und für den Komplex aus ETR1 – AHP1 347 ± 30 kDa.

In Tabelle III-3 sind die Werte für die Monomere, Dimere und dem Komplex gegenüber gestellt. Im Vergleich der theoretischen Größen für die jeweiligen Monomere, sind die Werte aus der Berechnung im Perrin Plot doppelt so groß und weisen somit auf eine Dimerisierung der einzelnen Proteine und einen Komplex aus ETR1-Dimer und AHP1-Dimer hin. Die letzte Spalte berücksichtigt für das Membranprotein ETR1 die Komplexierung des gereinigten Membranproteins durch das Detergenz (Molekulargewicht einer DDM Mizelle 72 kDa (Strop *et al.*, 2005)).

Tabelle III-3: Theoretische und gemessene Größen von AHP1 und ETR1 im Vergleich.

| | Theoretische Größe Monomer [kDa] | Theoretische Größe Dimer [kDa] | Größenbestimmung im Perrin Plot [kDa] | Geschätzte Größe inklusive DDM-Mizellen [kDa] |
|-------------|----------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|---|
| AHP1 | 18,3 | 36,6 | 41 ± 5 | - |
| ETR1 | 84,9 | 169,8 | 282 ± 21 | 242 |
| ETR1 – AHP1 | 103,2 | 206,4 | 347 ± 30 | 278 |

III.3 Quantifizierung der Interaktion zwischen AHP1 und ARR2

Die Signalweiterleitung im Zwei-Komponenten System, von einer Sensorhistidinkinase über ein Histidinphosphotransferprotein, endet mit der Übertragung einer Phosphorylgruppe auf ein Antwortregulatorprotein. In *A. thaliana* beeinflusst das Antwortregulatorprotein ARR2 das komplette Zwei-Komponenten-Signal Netzwerk und partizipiert am Ethylensignalweg (Hass *et al.*, 2004). In Hefe-Zwei-Hybridstudien konnte eine Interaktion von AHP1 und ARR2 gezeigt werden (Urao *et al.*, 2000). Durch die Bestimmung der Komplexbildung von AHP1 mit ARR2 über Messung der Fluoreszenzpolarisation, sollte diese Bindung quantifiziert werden. Eine Bestimmung der Dissoziationskonstante sollte zeigen, ob die Komplexbildung von AHP1 und ARR2 im physiologischen Bereich liegt.

III.3.1 Native Reinigung von ARR2 durch IMAC

Die Reinigung des ARR2-Proteins erfolgte wie unter II.4.5 beschrieben. Für die Bestimmung der Reinheit des ARR2-Proteins wurde die Probe dann mittels SDS-PAGE (II.5.3) in einem 10%igen Trenngel elektrophoretisch getrennt und das Gel silbergefärbt (II.5.4).

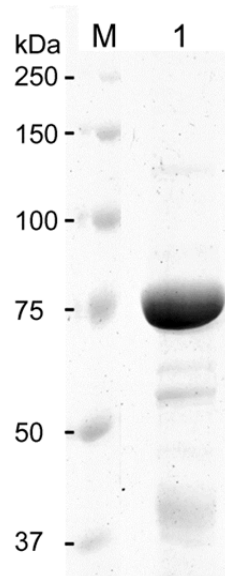


Abbildung III-13: Silbergefärbtes SDS-Polyacrylamidgel von gereinigtem ARR2 Protein. In Spur 1 erfolgte die Auftrennung von 10 μg ARR2 in einem 10%igen Trenngel. M = Proteingrößenstandard „Precision Plus Protein Dual Color Standard“.

In Abbildung III-13 ist eine deutliche Bande, die einem Protein mit einem Molekulargewicht von 74,3 kDa entspricht, zu erkennen, die sich ARR2 (74,4 kDa) zuordnen lässt. Auf dem Gel sind außerdem schwache Banden von Fremdprotein oder Abbaubanden zu erkennen. Diese Verunreinigungen betragen aber insgesamt weniger als 19% (Berechnung erfolgte über das Programm ImageJ Version 1.45s von Wayne Rasband, NIH, USA).

III.3.2 Strukturelle Untersuchung von ARR2 über CD Spektroskopie

Vor der Bestimmung der Sekundärstruktur wurde das gereinigte ARR2-Protein in einen Messpuffer aus 10 mM Kaliumphosphatpuffer und 6% Glycerin umgepuffert. Die CD-spektroskopische Messung erfolgte wie unter II.6.4 beschrieben.

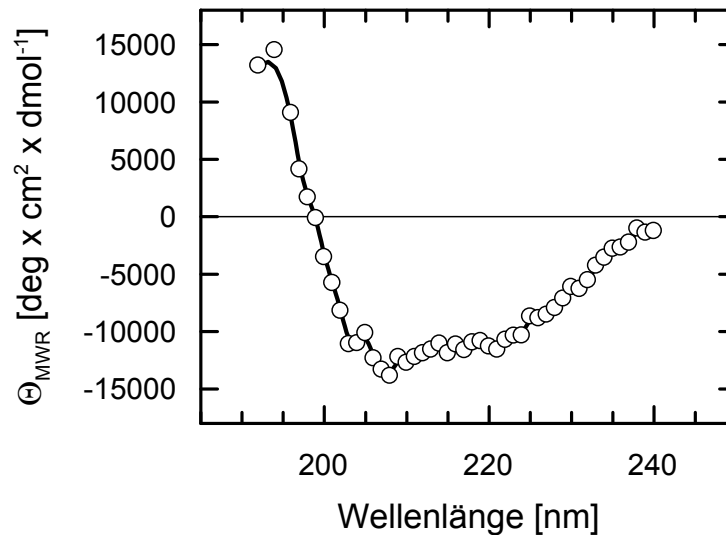


Abbildung III-14: CD-Spektroskopischen Analyse von ARR2. Eine Lösung mit 0,21 mg/ml ARR2 wurde zehnmal von 240 nm bis 190 nm in 0,5 nm Abständen und bei einer Bandbreite von 2 nm gemessen. Die Werte wurden gemittelt und um das Spektrum des Puffers korrigiert. Die Elliptizitätswerte wurden auf die mittlere Aminosäuremolmasse (Θ_{MWR}) normiert (II.4.4).

Abbildung III-14 zeigt die Ergebnisse der CD-Spektroskopie. Für die Werte unterhalb von 200 nm konnte kein Maximum ermittelt werden. Die Kurve zeigt einen Nulldurchgang bei 199 nm, ein Minimum bei 208 nm und eine Schulter mit einem Minimum bei 221 nm. Obwohl die Minima auf α -helikale Strukturen hinweist, deutet die Schulter auf einen zusätzlichen Anteil an β -Faltblattstrukturen hin. Die Dekonvolution des Spektrums und die Vorhersage der Sekundärstrukturanteile durch das Programm SOPMA ist in Tabelle III-4 aufgeführt. Die Vorhersage durch das Programm SOPMA deutet auf einen erhöhten Anteil von α -Helices hin. Die Werte aus der Dekonvolution mit den Programmen CONTINLL und SELCON3 sind im Vergleich zu der Vorhersage für den Anteil an α -Helices und β -Faltblattstrukturen etwa 5% und für den Anteil an β -Kehren um etwa 15% höher.

Tabelle III-4: Vergleich von berechneten und vorhergesagten Sekundärstrukturanteilen in ARR2

| Programm | Protein | α -Helix | β -Faltblatt | β -Kehre | Random Coil |
|----------|---------|-----------------|--------------------|----------------|-------------|
| CONTINLL | ARR2 | 29,4% | 15,5% | 22,8% | 32,3% |
| SELCON3 | ARR2 | 31,4% | 19% | 21% | 29% |
| SOPMA | ARR2 | 24,85% | 12,5% | 6,7% | 55,95% |

III.3.3 Bestimmung der Dissoziationskonstante des AHP1-GFP^{S65T} –

ARR2 Komplex

Im Zwei-Komponentensystem in höheren Pflanzen wird ein Signal von der Membran lokalisierten Sensorhistidinkinase über ein lösliches Phosphotransferprotein in den Nukleus zu dem Endakzeptor, einem *Arabidopsis Response Receiver* Protein (ARR), übertragen. Das Signal wird dabei in Form einer Phosphatgruppe von, zum Beispiel dem löslichen Phosphotransferprotein AHP1, in den Nukleus transportiert. Als mögliches Zielprotein kommt das *Arabidopsis Response Receiver* Protein 2 (ARR2) in Frage, welches durch Funktionsverlustmutanten einen Ethylen-insensitiven Phänotyp erzeugt (Hass *et al.*, 2004). Die Interaktion von AHP1 mit ARR2 konnte schon in Hefe-Zwei-Hybrid Versuchen gezeigt werden (Lohrmann *et al.*, 2001) und sollte durch Fluoreszenzpolarisationsmessungen quantitativ erfasst werden. Die Bestimmung der Dissoziationskonstante zwischen diesen Proteinen sollte zeigen, ob die Wechselwirkung der Proteine im physiologischen Bereich liegt.

In die Messung wurden 8 nM AHP1-GFP^{S65T} in FP Messpuffer eingesetzt und die Fluoreszenzänderung nach Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen an ARR2 gemessen. Die Messung erfolgte wie in II.7.2 beschrieben. Mit der beschriebenen Formel wurde die Kurve normalisiert.

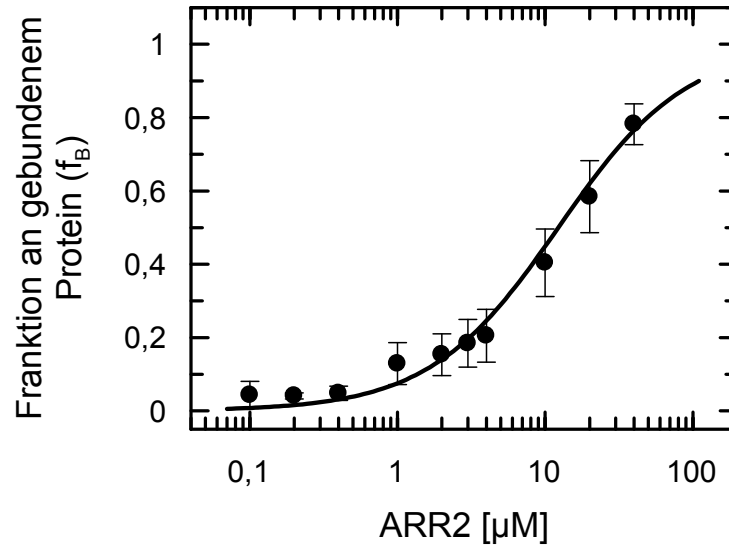


Abbildung III-15: Änderung der Fluoreszenzpolarisation in Abhängigkeit der ARR2 Konzentration. Zu 8 nM AHP1-GFP^{S65T} wurden unterschiedliche Konzentrationen an ARR2 zugegeben (●). Die Dissoziationskonstante des ARR2 – AHP1-GFP^{S65T} Komplexes wurde mit $12,3 \mu\text{M} \pm 1,9 \mu\text{M}$ bestimmt. Die Werte aus der Änderung der Fluoreszenzpolarisation wurden normiert. Die dargestellten Messpunkte sind jeweils drei- bis vierfach bestimmt.

Durch die Zugabe an ARR2 zu der AHP1-GFP^{S65T} Lösung konnte eine Fluoreszenzpolarisationsänderung gemessen werden. Aus den Messwerten wurde eine Bindungskurve für den AHP1 – ARR2 Komplex erstellt (siehe Abbildung III-15). Die Dissoziationskonstante für den Komplex wurde mit $12,3 \mu\text{M} \pm 1,9 \mu\text{M}$ bestimmt.

III.4 Quantifizierung der Interaktion von ETR1 und CTR1

CTR1 gilt als Startpunkt einer MAP Kinase Kaskade für die Weiterleitung des Ethylensignals und als direkter Interaktionspartner von ETR1 für die Signalweiterleitung nach Ethylenbindung.

Die Bindung zwischen ETR1 und CTR1 sollte in Fluoreszenzpolarisationsversuchen quantifiziert werden. Die benötigten Proteinmengen sollten rekombinant in *E. coli* hergestellt werden und unter nativen Bedingungen gereinigt werden. Um die korrekte Faltung nach der Reinigung zu untersuchen, sollte die Sekundärstruktur von CTR1 durch CD Spektroskopie bestimmt werden.

Aufgrund der Kinaseaktivität von nativem CTR1 sollte unter Verwendung von radioaktiv markiertem ATP die Phosphorylierungsaktivität des Proteins und damit die native Konformation des CTR1-Proteins nachgewiesen werden.

III.4.1 Native Reinigung von CTR1 Protein durch IMAC

Um die Reinheit des nativ gereinigten CTR1 Proteins (II.4.3) zu überprüfen, wurde das rekombinant hergestellte Protein mittels SDS-PAGE (II.5.3) in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend silbergefärbt (II.5.4).

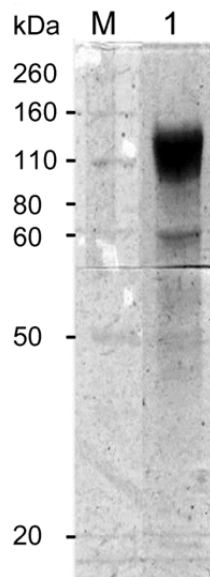


Abbildung III-16: Auftrennung von gereinigtem CTR1 in einem 10%igen silbergefärbten SDS-Polyacrylamidgel. In Spur 1 wurden 5 µg gereinigtes CTR1 aufgetragen. M = Proteingrößenstandard „Precision Plus Protein Dual Color Standard“.

Abbildung III-16 zeigt eine deutliche Bande im Bereich von 110 kDa und eine schwache distinkte Bande unterhalb von 60 kDa. Für die Berechnung der Größe aus der Laufstrecke ermittelt sich ein Molekulargewicht von 96,4 kDa für die deutliche Bande und 53,7 kDa für die schwache Bande. Im Vergleich der Bandenintensitäten kann für das kleinere Molekulargewichte mit dem Programm ImageJ (Version 1.45s von Wayne Rasband, NIH, USA) ein Menge von 8,6% bestimmt werden. Die deutliche Bande mit dem Molekulargewicht von 96,4 kDa wurde dem CTR1 Protein, mit einen Molekulargewicht von 97,3 kDa, zugeordnet.

III.4.2 Untersuchung der Sekundärstruktur von CTR1

Das CTR1 Protein wurde wie unter II.4.3 beschrieben gereinigt, in 10 mM Kaliumphosphatpuffer und 6% Glycerin umgepuffert und auf 0,108 mg/ml verdünnt. Die Proteinprobe wurde im Jasco 715 spektralphotometrisch im Fern-UV-Bereich von 240 bis 190 nm bei Raumtemperatur gemessen. Puffer und Probe wurden jeweils zehnmal gemessen, gemittelt und voneinander subtrahiert. Nach der in II.6.4

beschriebenen Formel wurde die Elliptizität auf das durchschnittliche Molekulargewicht der Aminosäuren normiert. Die Dekonvolution der Sekundärstrukturanteile erfolgte mit den Programmen CONTINLL und SELCON3.

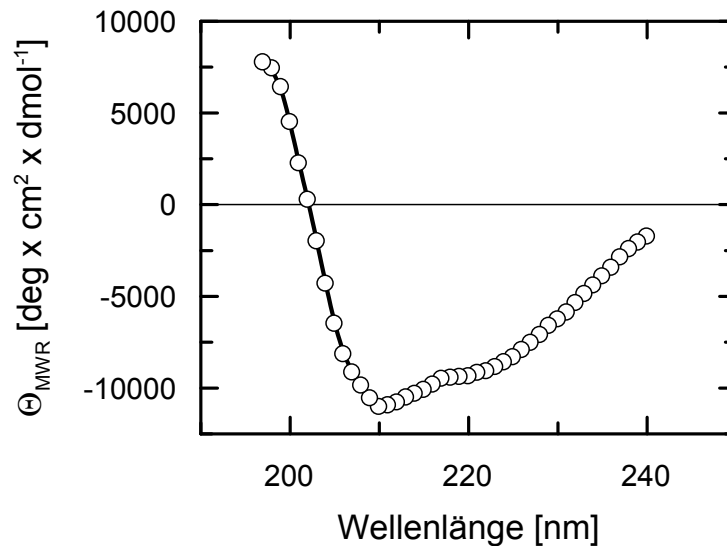


Abbildung III-17: CD-Spektrum von gereinigtem CTR1. Eine Lösung von 0,1 mg/ml CTR1 in 10 mM Kaliumphosphatpuffer und 6% Glycerin wurde zehnmal von 240 nm bis 190 nm in 0,5 nm Abständen und einer Bandbreite von 2 nm gemessen. Die gemessenen Spektren wurden gemittelt und um das Spektrum des Puffers korrigiert. Die Werte aus der Messung der Elliptizität wurden auf die mittlere Aminosäuremolmasse (Θ_{MWR}) normiert (II.4.4).

In Abbildung III-17 ist deutlich zu erkennen, dass ausgeprägte Sekundärstrukturen vorhanden sind. Die Kurve zeigt ein Maximum bei 197 nm. Dieser Wert liegt zwischen dem für α -Helix- (195 nm) und β -Faltblattstrukturen (198 nm) typischen Maximum. Typische Werte für α -Helices sind der Nulldurchgang bei 202 nm und Minima bei 222 nm und 208 nm (siehe Abbildung II-1). Das Spektrum in Abbildung III-17 zeigt ein ausgeprägtes Minimum bei 210 nm und eine Schulter bei 220 nm. Der Nulldurchgang liegt bei 202 nm und deutet zusammen mit den Minima bei 210 und 220 nm auf einen ausgeprägten α -Helix Anteil mit β -Faltblattstrukturen hin.

Tabelle III-5: Vergleich von berechneten und vorhergesagten Sekundärstrukturanteilen in CTR1

| Programm | Protein | α -Helix | β -Faltblatt | β -Kehre | Random Coil |
|----------|---------|-----------------|--------------------|----------------|-------------|
| CONTINLL | CTR1 | 35,4% | 16,8% | 18,7% | 29,2% |
| SELCON3 | CTR1 | 26,9% | 18% | 24,5% | 33,9% |
| SOPMA | CTR1 | 29,6% | 16,3% | 17,1% | 37,1% |

Die für CTR1 vorhergesagten Sekundärstrukturanteile liegen für α -Helix Strukturen bei etwa 30%, bei β -Faltblatt bei etwa 16% und für β -Kehren zwischen 16 und 17%. Die Auswertung der CD-Daten mit den Programmen CONTINLL und SELCON3 zeigt ein ähnliches Ergebnis. Die Abweichung für α -Helix Strukturen liegt bei $\pm 4\%$. Die Abweichung der Anteile an β -Faltblattstrukturen ist etwa 1%. Der Anteil an β -Kehren ist je nach verwendetem Dekonvolutions-Programm zwischen 2 und 8% höher.

III.4.3 Nachweis der Kinaseaktivität von CTR1

Das nativ gereinigte (II.4.3) CTR1 Protein (III.3.2) wurde für Aktivitätsmessungen wie unter II.8.1 beschrieben mit γ - ^{32}P -ATP inkubiert. Über eine SDS-PAGE (II.5.3) wurde die Probe getrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen (II.5.5). Die Membran wurde getrocknet und für die Radiographie zwischen Plastikfolie in einer Radiographiekassette (BAS-Cassette) gelegt.

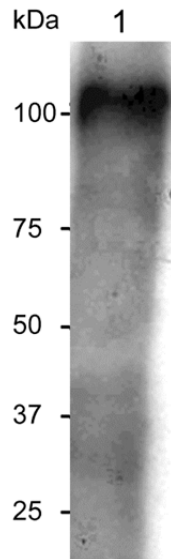


Abbildung III-18: Radiographische Aufnahme der CTR1-Kinaseaktivität. CTR1 wurde zusammen mit 0,5 μCi $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ in einen Puffer mit 50 mM HEPES/NaOH pH 7,4, 10 mM MgCl_2 , und 10 mM MnCl_2 für 30 Minuten inkubiert. In Spur 1 wurden 3 μg CTR1 in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert.

Abbildung III-18 zeigt eine Bande im Bereich von 100 kDa. Über die Laufstrecke wurde für die Bande ein Molekulargewicht von 92,7 kDa ermittelt und konnte dem CTR1 mit 97,3 kDa zugeordnet werden konnte. Die Schwärzung in der Radiographie, lässt den Rückschluss zu, dass radioaktives ATP markiertes Phosphat in das Protein inkorporiert wurde. Das gereinigte CTR1 Protein zeigt im Rückschluss eine Autokinaseaktivität.

III.4.4 Nachweis der Transkinaseaktivität von CTR1

Um die Frage zu klären, ob CTR1 das Phosphat auch auf ein passendes Substrat übertragen kann, sollte phosphoryliertes CTR1 mit dem Rinder Myelin Basischen Protein (*bovine myelin basic protein*, MBP) gemischt werden. Das für MAP Kinasen typische Substrat MBP sollte die Phosphorylgruppe von CTR1 übernehmen und als

radioaktive Bande im SDS-Polyacrylamidgel bei 18,4 kDa detektiert werden (Erickson *et al.*, 1990).

Das CTR1-Protein wurde wie beschrieben gereinigt und entweder in einem Puffer aus 50 mM HEPES/NaOH pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 10 mM MnCl₂ (Puffer C1) oder aus 50 mM TRIS/HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 2 mM DTT (Puffer C2) umgepuffert (II.5.1). CTR1 wurde mit MBP in einem molaren Verhältnis von eins zu fünf gemischt und mit radioaktiv markiertem ATP für 30 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt. Nach einer SDS-PAGE (II.5.3) in einem 15%igen Trenngel erfolgte die Immobilisierung der Proteine durch einen Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran (II.5.5). Die Radiographie erfolgte wie unter II.7.1 beschrieben unter Verwendung einer BAS Kasette.

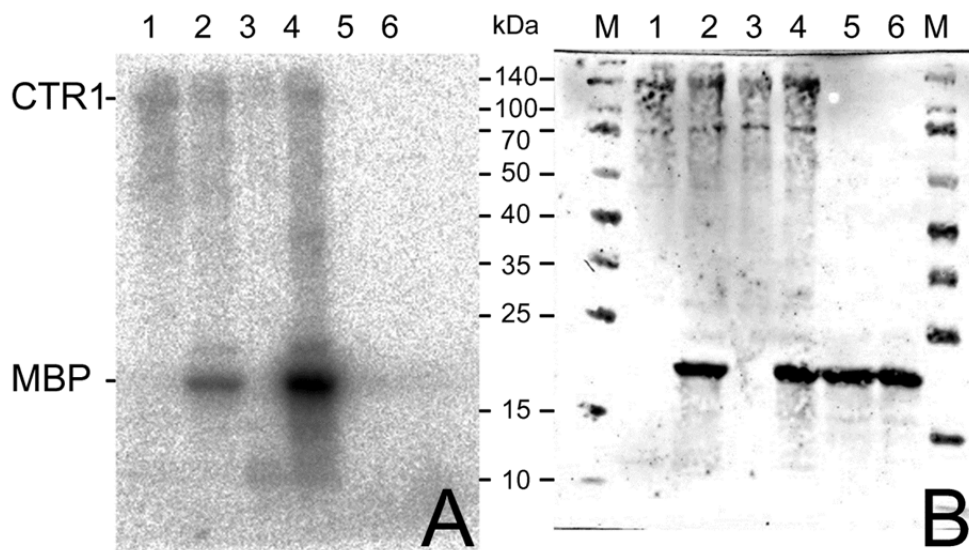


Abbildung III-19: Transkinaseaktivität von CTR1. Die chromatographische Trennung erfolgte in einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel. Die Proben wurden auf Nitrocellulosemembran immobilisiert. A: Radiographie der Nitrocellulosemembran. Die Spur 1 und 3 enthalten je 5 µg CTR1, Spur 2 und 4 enthalten je 5 µg CTR1 und 1 µg MBP und Spur 5 und 6 enthalten je 1 µg MBP. In Spur 1, 3 und 5 wurde ein Puffer aus 50 mM HEPES/NaOH pH 7,4, 10 mM MgCl₂ und 10 mM MnCl₂ und in Spur 2, 4 und 6 ein Puffer aus 50 mM TRIS/HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂ und 2 mM DTT verwendet. B: Ponceaufärbte Nitrocellulosemembran. M = Proteingrößenstandard „Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder“

Abbildung III-19A zeigt das Ergebnis der Radiographie des Transkinaseversuchs von CTR1 mit MBP. Spur 1 bis 4 zeigt sowohl in der Radiographie (A) als auch in der Ponceau Färbung (B) im Bereich von 100 bis 140 kDa eine Bande, für die sich aus der Laufstrecke ein Molekulargewicht von 123 kDa ermittelt und die CTR1 zugeordnet wurde. Eine Bande mit einem Molekulargewicht von 75,8 kDa kann in der Ponceau Färbung (B) angefärbt werden, kann aber in der Radiographie (A) nicht nachgewiesen werden. In Spur 2, 4 5 und 6 konnte in der Ponceau Färbung (B) eine Bande mit einem Molekulargewicht von 18,9 kDa ermittelt und dem MBP zugeordnet werden, welches ein Molekulargewicht von 18,6 kDa besitzt (*bovine* MBP, Monomer). In der Radiographie (A) zeigt sich eine deutliche Bande in Spur 2 und eine sehr intensive Bande in Spur 4, nicht aber in den Spuren 5 und 6.

III.4.5 Bestimmung der Dissoziationskonstante des ETR1 – CTR1

Komplexes

Die Bestimmung der Dissoziationskonstante erfolgte wie in II.7.2 beschrieben über die Messung des Tryptophanfluoreszenzquenchs. Es wurden 200 nM gereinigtes CTR1 Protein in 500 µl FP Messpuffer in einer Quarz Semi-Mikro Küvette vorgelegt. Durch die Zugabe von tryptophanfreiem ETR1 Protein, in steigenden Konzentrationen zwischen 0,01 µM und 10 µM, wurde das Fluoreszenzsignal gelöscht. Die Auswertung der Daten erfolgte wie in II.7.2 beschrieben.

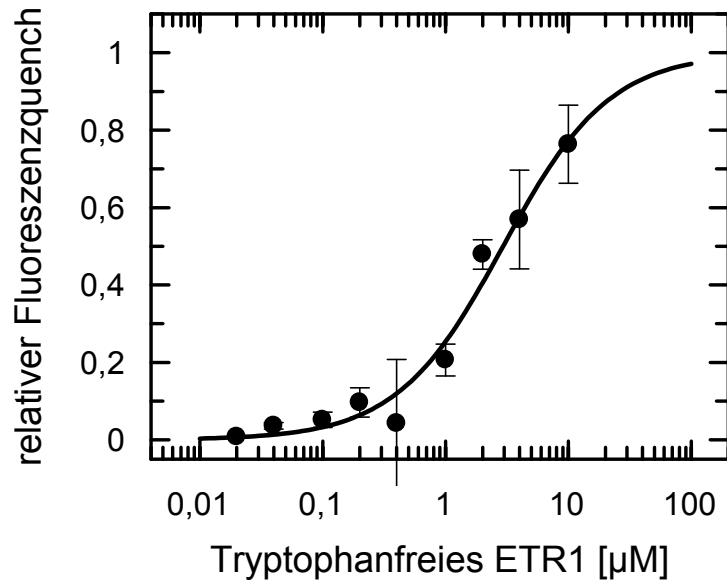


Abbildung III-20: Tryptophanfluoreszenzquench in Abhängigkeit der Konzentration von tryptophanfreiem ETR1. Für die Komplexbildung von ETR1 mit CTR1 (●) konnte eine Dissoziationskonstante von $2,94 \mu\text{M} \pm 0,74 \mu\text{M}$ bestimmt werden. Die einzelnen Messpunkte wurden in drei verschiedenen Messungen bestimmt und normiert.

Abbildung III-20 zeigt die relative Änderung der Fluoreszenzintensität, aufgetragen gegen die Konzentration von tryptophanfreiem ETR1 Protein. Die Zugabe von tryptophanfreiem ETR1 zeigt eine Fluoreszenzlöschung. Für die Bindungskurve des ETR1-CTR1 Komplex wurde eine Dissoziationskonstante von $2,94 \mu\text{M} \pm 0,74 \mu\text{M}$ bestimmt.

III.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse wurden in einer schematischen Darstellung in Abbildung III-21 zusammengefasst. Die zuvor in Abbildung I-2 gezeigten uncharakterisierten Übertragungswege konnten um die nun identifizierten Dissoziationskonstanten ergänzt werden.

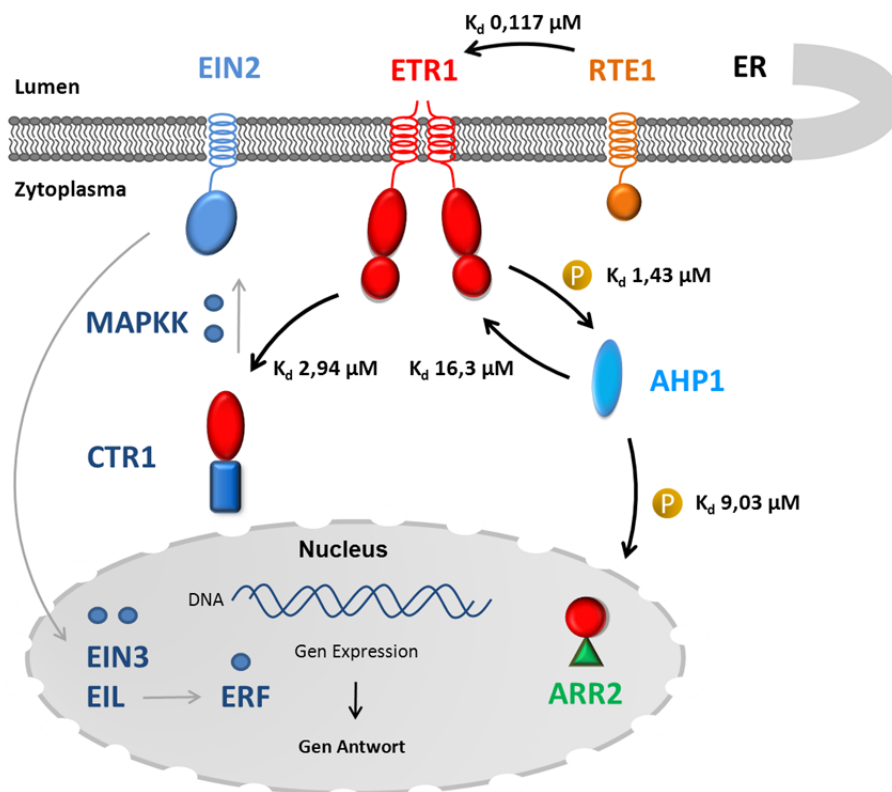


Abbildung III-21: Schematische Darstellung von Interaktionen zwischen Komponenten des Ethylensignalwegs. Die schwarzen Pfeile stellen die in dieser Arbeit charakterisierten Interaktionen und die mögliche Signalübertragung in Form von Phosphorylgruppen (P) dar. Endoplasmatisches Retikulum (ER). Die K_d Werte sind für die Bindungen zwischen wildtypischen Proteinen angegeben.

Für das erst 2006 identifizierte Membranprotein RTE1 konnte eine hoch affine Bindung mit $117 \text{ nM} \pm 9 \text{ nM}$ gezeigt werden, die durch die Substitution von Cystein 161 durch Tyrosin um den Faktor 11 herabgesetzt werden kann. Durch Auswerten der Fluoreszenzpolarisationsdaten konnte die Stöchiometrie von AHP1 und ETR1

bestimmt werden. Beide Proteine liegen als Dimer vor und bilden einen Komplex aus zwei Dimeren. Die Dissoziationskonstante dieses Komplexes konnte mit $1,43 \mu\text{M} \pm 0,62 \mu\text{M}$ bestimmt werden, die aber durch Ethylen- oder KCN-Bindung um das etwa fünf- bis sechsfache steigt und somit die Affinität senkt. Zusätzlich konnte durch Imitieren einer für die Bindung wichtigen Phosphorylgruppe die Relevanz des Phosphorylierungsstatus auf die ETR1 – AHP1 Komplexbildung gezeigt werden. *In vivo* wird diese Phosphorylgruppe wahrscheinlich auf ein ARR, wie zum Beispiel ARR2, weiter übertragen. Für die Interaktion von AHP1 mit ARR2 konnte über Fluoreszenzpolarisationsmessungen ein K_d -Wert von $12,3 \mu\text{M} \pm 1,9 \mu\text{M}$ in dieser Arbeit bestimmt werden.

Der Signaltransduktionsweg über CTR1 als Startpunkt einer MAPKinase-Kaskade wurde über Messungen des Tryptophanfluoreszenzquenchs bei Zugabe von ETR1 untersucht. Für die Komplexbildung des nativen und funktionellen CTR1 und dem Ethylenrezeptor ETR1 konnte in diesen Messungen eine Dissoziationskonstante von $2,94 \mu\text{M} \pm 0,74 \mu\text{M}$ bestimmt werden.

IV Diskussion

Die weltweiten Ressourcen an pflanzlichen Produkten werden durch die weiter steigende Weltbevölkerung in Form von Nahrung und Kleidung, aber auch durch die gesteigerte Nachfrage nach CO₂ neutralen Energieträgern, als Ersatz für fossile Brennstoffe, zukünftig immer stärker beansprucht.

Äußere Einflüsse wie biotischer und abiotischer Stress verringern die Produktivität von Pflanzen und senken damit den Ertrag. Die Verluste durch Pflanzenschädlinge, Unkraut und Pathogene in der weltweiten Landwirtschaft wurde für die Jahre 2001 bis 2003 je nach angebaute Kulturpflanze auf 26 bis 40% geschätzt (Oerke, 2006).

Um den zukünftig weiter steigenden Bedarf an Nutzpflanzen decken zu können, muss verstanden werden, wie sich Pflanzen entwickeln, wachsen und auf Umweltreize reagieren. Grundlegende Erkenntnisse zur Ethylensignalverarbeitung sind notwendig, um Ernteauffälle und Lagerverluste zukünftig zu vermindern. Das Phytohormon Ethylen ist an vielen Verlusten beteiligt, die vor der Ernte den Erntertrag mindern können, da es die Reaktion der Pflanze bei Pathogenbefall, Wassermangel, Wasserüberschuss und physiologischen oder mechanischen Schäden an der Pflanze regelt. Weiterhin ist Ethylen aber auch an der Problematik des Ernteverlusts nach der Ernte beteiligt. Die Lagerungsfähigkeit und Haltbarkeit der pflanzlichen Produkte wird durch Ethyleninduzierte Reifungsprozesse direkt verkürzt.

Daher ist der Ethylensignalweg bis heute ein wichtiges und intensiv untersuchtes Feld der Phytohormonforschung. Obwohl Ethylen als Phytohormon schon seit etwa 100 Jahren erforscht wird, ist der genaue Transduktionsweg weiterhin unklar. Viele Komponenten des Ethylensignalwegs konnten über genetischen und

molekularbiologischen Studien identifiziert werden. Doch erst im letzten Jahrzehnt wurden die Interaktionen dieser Komponenten auch durch biochemische Versuche weiter geklärt.

Die Charakterisierung des Ethylensignalwegs in der vorliegenden Arbeit stellt eine Grundlage für weitere biochemische Untersuchungen auf molekularer Ebene dar. Unter Verwendung von *E. coli*-Stämmen und abgestimmter Expressionsmethoden konnten die am Ethylenweg partizipierenden Proteine RTE1, AHP1, CTR1 und ARR2 für diese Arbeit rekombinant exprimiert und in hoher Reinheit isoliert werden. Durch fluoreszenzspektroskopische Methoden sollten die Proteine auf ihre Struktur und ihre Bindungseigenschaften mit dem Rezeptorprotein ETR1 hin untersucht werden, das den Startpunkt der Ethylensignalkette markiert.

IV.1 Untersuchungen zu dem Membranprotein RTE1

IV.1.1 Bestimmung der Bindungskonstante des ETR1-RTE1 Komplex

Das in Pflanzen und Protisten konserviert vorkommende Membranprotein RTE1, konnte 2006 als ein negativer Regulator der Ethylenantwort identifiziert werden (Resnick *et al.*, 2006), welcher die Sensitivität von ETR1 für Ethylen reduziert. Da RTE1 und ETR1 im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert werden konnten (Dong *et al.*, 2008), wurde eine direkte Interaktion der beiden Proteine diskutiert. Für die dominanten *etr1* Allele, wie *etr1-2*, konnte durch Phänotypanalyse von *Arabidopsis* eine hohe Abhängigkeit von RTE1 gezeigt werden, während dominante Allele wie *etr1-1* unabhängig von RTE1 sind (Resnick *et al.*, 2008). Die Mutante RTE1-1, die durch Substitution von Cystein-161 durch Tyrosin in einer hoch konservierten Region entsteht, stellt eine Funktionsverlustmutante dar, die wahrscheinlich nicht an ETR1 binden kann (Resnick *et al.*, 2006).

Nachdem RTE1 in ausreichender Menge aus *E. coli* exprimiert, aus der Zellmembran solubilisiert und durch eine native Reinigung in hoher Reinheit isoliert wurde, sollte das Protein auf seine Faltung durch CD-Spektroskopie und auf eine putative Protein-Protein Interaktion mit ETR1 hin analysiert werden.

Für ETR1 lag bereits ein Protokoll für eine denaturierende Reinigung und Renaturierung vor. In CD Spektroskopischen Versuchen konnte gezeigt werden, dass ETR1 in eine lösliche Form zurückgefaltet werden konnte. In Kinase-Experimenten konnte die Autokinaseaktivität des ETR1 Proteins erfolgreich gezeigt werden (Voet van Vormizeele & Groth, 2008).

Die Proteine RTE1 und RTE1^{C161Y} zeigten in der CD-Spektroskopie, anders als von dem Vorhersageprogramm SOPMA erwartet, einen hohen Anteil an β -Faltblättern. Diese Information bedeutet nicht zwingend, dass das Protein falsch gefaltet ist, denn das Vorhersageprogramm SOPMA konnte in Tests an bekannten Proteinen nur 69.5% der Sekundärstrukturen korrekt berechnen (Geourjon & Deleage, 1995). Somit kann jede Vorhersage immer nur ein Anhaltspunkt für die Verteilung der Sekundärstrukturanteile sein.

Die CD-Spektroskopie zeigt, dass das Membranprotein RTE1 in einer stabilen, gefalteten Konformation vorliegt und nicht in einem ungeordneten Zustand. Da es für das RTE1 Protein keinen Aktivitätstest gibt, können die Ergebnisse aus der CD-Spektroskopie nur als Hinweis für eine native Struktur angesehen werden. Die Ergebnisse der CD-Spektroskopie der Substitutionsmutante RTE1^{C161Y} zeigen, dass auch dieses Protein in einer stabilen und geordneten Faltung vorliegt. Wichtig für die Interaktionsversuche ist, dass die eingebrachte Punktmutation C161Y keine signifikante Änderung der Sekundärstruktur erzeugt hat. Eine starke Abweichung in den Sekundärstrukturen würde darauf hindeuten, dass die Funktionsverlustmutante

C161Y auf einem falschen Protein beruht, das in der Zelle möglicherweise aggregiert oder abgebaut wird, sodass keine Interaktion mit ETR1 erfolgen kann.

Die Ergebnisse zur Bestimmung der Komplexbildungskonstante zeigen einen deutlichen Unterschied zwischen wildtypischem Protein und der Funktionsverlustmutante RTE1^{C161Y}. Diese Messungen unterstreichen die korrekte Faltung des wildtypischen Proteins. Die niedrige Dissoziationskonstante zwischen ETR1 und RTE1 von 117 nM deutet auf eine starke Bindung dieser Proteine hin, was für eine spezifische Bindung spricht. Diese Bindungskonstante ist vergleichbar mit anderen bekannten Protein-Protein Interaktionen, wie etwa dem NuSB – S10 Komplex (100 nM, Mason *et al.*, 1992), dem NusA – core RNA Polymerase Komplex (100 nM, Greenblatt & Li, 1981), dem Ras – Raf Komplex (50 nM, Warne *et al.*, 1993) oder den Komplex EGF – EGF Rezeptor (20-30 nM, Zhou *et al.*, 1993).

Die Bindung zwischen ETR1 und der Funktionsverlustmutante RTE1^{C161Y} zeigt hingegen einen fast 12-fachen höheren K_d Wert. Sterische Hinderung durch den Phenolring des Tyrosinrests oder eine Veränderung der Konformation könnten die Ursache der geringeren Affinität der Mutante sein. Die schwächere Bindung kann direkt auf die Punktmutation zurückgeführt werden.

Die Ergebnisse der Fluoreszenzpolarisationsmessung werden durch *in vivo* Studien von Dong *et al.* belegt, welche die Interaktion von ETR1 mit RTE1 durch bimolekulare Fluoreszenzkomplementation und Co-Immunpräzipitation zeigen konnten (Dong *et al.*, 2010).

Sowohl genetische, als auch die in dieser Arbeit gezeigten biochemische Analysen zeigen für ETR1 und RTE1 eine hoch spezifische und funktionelle Interaktion. Die Ergebnisse von Dong *et al.* (2010) deuten darauf hin, dass sich ETR1 und RTE1 in der Vergangenheit möglicherweise gemeinsam entwickelt haben. Die Frage, warum

RTE1 in vielen anderen Organismen, wie Protozoen und Metazoen, die keine Ethylenrezeptoren besitzen, vorkommt, bleibt offen und gibt einen Hinweis auf weitere Funktionen von RTE1 und RTE1-homologen Proteinen.

IV.2 Untersuchungen zum ETR1 – AHP1 Komplex

IV.2.1 Untersuchungen zu der Struktur von AHP1

Vergleicht man die Kristallstruktur des Phosphotransferproteins ZmHP2 aus *Zea mays* (Sugawara *et al.*, 2005) mit AHP1 durch Sequenzvergleich der Aminosäuren, können 43% identische und 39% ähnliche Reste bestimmt werden (Programm MULTALIN, Corpet 1988, Sequenzvergleich siehe Anhang,). Aus diesem Vergleich kann vermutet werden, dass AHP1 ebenfalls einen hohen Anteil α -Helix Strukturen besitzt. Dies konnte in der CD Spektroskopie des AHP1 Proteins in Lösung bestätigt werden. Die hohe Strukturkonservierung innerhalb der Zwei-Komponentensysteme konnte beispielsweise von Janiak-Spens *et al.* (1999) gezeigt werden. Beispielsweise kann das Antwortregulator-Protein CheY aus *E. coli* mit dem Histidin-Phosphotransfer-Proteins YPD1 aus *Saccharomyces cerevisiae* über die Artengrenze hinweg interagieren und die nachgeschalteten Antwortregulatorproteine phosphorylieren.

In der CD Spektroskopie von AHP1 konnten Minima bei 209 nm und 220 nm (typische Minima für α -helikale Strukturen sind 208 nm und 222 nm) und ein ausgeprägter Cotton-Effekt α -helikale Strukturen vermuten lassen. Das Vorhersageprogramm SOPMA bestimmte aus der Aminosäuresequenz einen α -helikalen Anteil von 77,3%. Der Anteil an β -Faltblatt- und β -Kehre-Strukturen wurde mit unter 2,6% beziehungsweise 3,9% bestimmt.

Die Dekonvolution bestätigte den hohen Anteil an α -helikalen Strukturen mit etwa 60%. Der geringe Anteil an β -Faltblattstrukturen bestätigte sich ebenfalls. Nur ein 8% bis 9% höher β -Kehre Anteil wurde in der Struktur gefunden, was aber auf Hinblick der Genauigkeit der Programme noch tolerierbar bleibt.

Ein hoher Anteil an Helix Strukturen ist typisch für die *histidine-containing phosphotransfer*-(HPt)-Domäne, welche immer aus einem Vier-Helix Bündel Motiv bestehen, dessen Funktion nur durch die Länge und Orientierung variiert wird (Perry & Wright, 2011). Dies konnte in vielen HPt-Proteinen gezeigt werden, wie zum Beispiel in der P1-Domäne von CheA (Zhou *et al.*, 1996), der HPt-Domäne von ArcB aus *E. coli* (Kato *et al.*, 1997) und Spo0B Protein aus *Bacillus subtilis* (Varughese *et al.*, 1998). Darüber hinaus konnte das Vier-Helix-Bündel Motiv auch in eukaryotischen Organismen wie *Saccharomyces cerevisiae* für das HPt-Protein YPD1 (1QSP) und MtHPt (3US6) aus dem Schneckenklee *Medicago truncatula* durch Kristallisation und Röntgenbeugung gefunden werden (Xu *et al.*, 1999a, Xu *et al.*, 1999b, Ruszkowski *et al.*, Veröffentlichung folgt).

IV.2.2 Untersuchungen zu der Interaktion von ETR1 und AHP1

Mit dem Hefe-Zwei-Hybrid System konnte die Interaktion zwischen ETR1 und AHP1 bereits gezeigt werden (Urao *et al.*, 2000). Im Hefe-Zwei-Hybrid System können jedoch nur lösliche Proteine verwendet werden. Außerdem können bei hydrophoben Proteinen, wie es der Fall bei Membranproteinen ist, falsch positive Ergebnisse aufgrund der möglicherweise falschen Faltung der Proteine, nicht ausgeschlossen werden.

Als Alternative zu dem Hefe-Zwei-Hybrid System kann das Split-Ubiquitin System verwendet werden, welches Interaktionen auch mit Membranproteinen nachweisen

kann. Für eine Quantifizierung der Bindungskonstante müssen jedoch andere Methoden wie die Fluoreszenzpolarisation verwendet werden. Für diese Untersuchungen müssen die Interaktionspartner ETR1 und AHP1 als gereinigte und native Proteine in Lösung vorliegen.

Die Ergebnisse der Interaktion zwischen ETR1 und AHP1-GFP^{S65T} sind in Abbildung III-7 dargestellt. Die Komplexbildung konnte über die Änderung der Fluoreszenzpolarisation verfolgt werden, die durch eine Reduzierung der Rotationsgeschwindigkeit des fluoreszierenden AHP1-GFP^{S65T}-Proteins auf die Zugabe von ETR1-Protein zurückzuführen ist. Die Zugabe desselben Volumens von Messpuffer konnte keine Änderung der Fluoreszenzpolarisation zeigen (Scharein *et al.*, 2008).

Für die Dissoziationskonstante des ETR1 - AHP1-GFP^{S65T}-Komplex wurde ein Wert von $1,43 \mu\text{M} \pm 0,29 \mu\text{M}$ bestimmt. Typische K_d Werte für Interaktionen in Zwei-Komponenten Systemen liegen zwischen 60 fM für den Trypsin – Pancreas Trypsin Inhibitor aus *H. sapiens* (Vincent & Lazdunski, 1972) bis $17 \mu\text{M}$ für die Chemotaxisproteine CheA – CheW aus *E. coli* (Gegner & Dahlquist, 1991).

Diese Ergebnisse erweitern das schon vorhandenen Wissen aus Hefe-Zwei-Hybridstudien, die nur mit dem löslichen Teil von ETR1 erfolgten (Urao *et al.*, 2000), um die Dissoziationskonstante zu der Interaktion zwischen dem Volllängen-Protein ETR1 und dem Histidin-Phosphotransfer Protein AHP1.

Die Quantifizierung der Dissoziationskonstante durch Fluoreszenzpolarisation gibt die Möglichkeit, in Zukunft *cross-talk* zwischen Phytohormon Signal-Transduktionswegen, wie zum Beispiel zwischen Ethylen und Abszissinsäure (Kar, 2011) oder zwischen Ethylen und Cytokin, die beide AHPs binden können (Pekárová *et al.*, 2011), besser deuten zu können. Um einen tieferen Einblick in die Interaktion

zwischen ETR1 und AHP1 und die Funktion als Zwei-Komponenten-System in *A. thaliana* zu bekommen, stellt sich die Frage nach der Bedeutung des Phosphorylierungs-Status auf die Protein-Protein Bindung. Dieser Frage wurde über verschiedene Phosphorylierungsmutanten nachgegangen.

IV.2.3 Imitieren einer Phosphorylierung durch Substitution der Phosphorylierungsstelle durch Glutaminsäure

Um zu untersuchen, welchen Einfluss der Phosphorylierungszustand auf das Bindungsgleichgewicht mit ETR1 hat, wurden die für die Signalübertragung im Zwei-Komponenten-System wichtigen, konservierten Aminosäurereste Histidin und Aspartat der Proteine ETR1 und AHP1 durch Alanin oder Glutamat substituiert. Die im Alanin fehlende polare Gruppe und die Verkürzung der Seitenkette imitieren hierbei den unphosphorylierten Status des Proteins und erzeugen so eine ungeladene Kavität.

Dem entgegen steht die Änderung des Aminosäurerests Histidin beziehungsweise Aspartat zu Glutamat. Die polare Seitenkette von Glutamat imitiert durch die räumliche Lage der Seitenkette die Phosphorylierung sowohl *in vitro* (Horák *et al.*, 2008, Huffine & Scholtz, 1996) als auch *in vivo* (Gao *et al.*, 2006). Einen strukturellen Vergleich von phosphoryliertem Aspartat und Histidin gegen Glutamat zeigt Abbildung IV-1. In der linken Spalte ist die räumliche Nähe des Carbonsäurerests eines Glutamats zu der Phosphorylgruppe eines phosphorylierten Aspartats, für das Beispiel eines Antwortregulator-Proteins und eines Transkriptionsfaktors, dargestellt. In der rechten Spalte sind für den Vergleich eines phosphorylierten Histidins mit einem Glutamat die entsprechenden Strukturbereiche einer Nukleosid Diphosphat Kinase und einer Phosphoglycerat Mutase gezeigt. Die in rosa gefärbte Kohlenstoffkette des Glutamats kann in diesen Beispielen die negative Ladung in

Form von Sauerstoffen (rot) in dieselbe Position, wie die der Phosphorylgruppe bringen.

Durch seine negative Ladung und das vergleichbare Oberflächen-Volumen sollte Glutamat somit in der Lage sein, das Phospho-Aspartat und Phospho-Histidine hinreichend zu imitieren.

Die Möglichkeit, eine Phosphorylierung imitieren zu können, wurde auch schon an dem Protein SH4 aus *Leishmania* gezeigt, indem ein Threonin durch ein Glutamat ersetzt wurde (Tournaviti *et al.*, 2009). Diese Eigenschaft wurde ebenso in Versuchen mit dem Antwortregulator-Protein ARR22 eingesetzt, wo ebenfalls das für das Zwei-Komponenten-System wichtige konservierte Aspartat durch Glutamat substituiert wurde (Horák *et al.*, 2008).

In Versuchen mit dem *histidine-containing*-Protein (HPr) aus *Bacillus subtilis* konnte sowohl eine Phosphorylierung von Histidin als auch von Serin imitiert werden, indem der phosphorylierbare Aminosäurerest durch Glutamat substituiert wurde (Huffine & Scholtz, 1996).

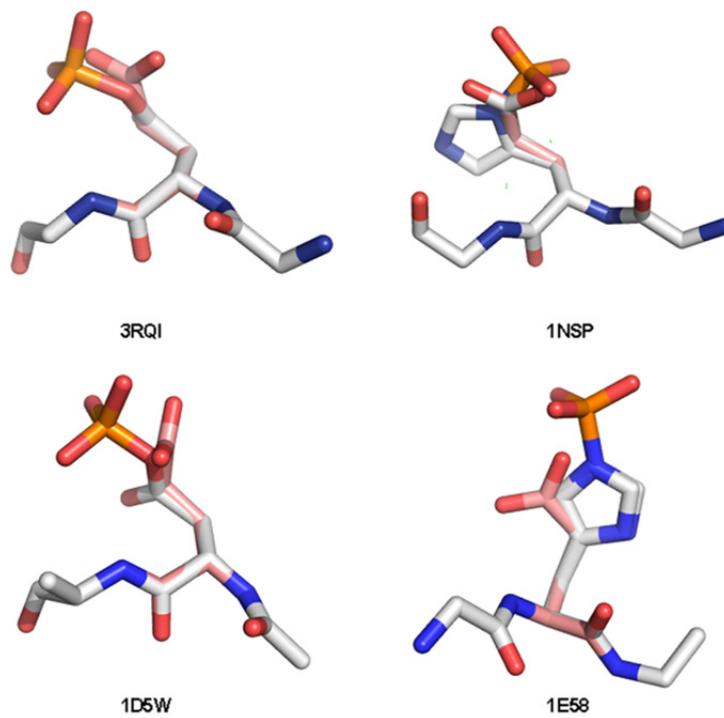


Abbildung IV-1: Struktureller Vergleich von Glutamat mit einen phosphorylierten Aspartatrest (links) beziehungsweise einem Phosphohistidinrest (rechts). Die strukturelle Information für Phospho-Aspartat stammen aus dem Antwort Regulator Protein aus *Burkholderia pseudomallei* (pdb-code 3RQI) und der Empfängerdomäne des Transkriptionsregulierenden Proteins FixJ aus *Sinorhizobium meliloti* (pdb-code 1D5W). Die Koordinaten des Phospho-Histidins stammen aus der Nukleosid Diphosphat Kinase aus *Dictyostelium discoideum* (pdb-code 1NSP) und der Phosphoglycerat Mutase aus *E. coli* (pdb-code 1E58). Die Visualisierung und Koordinierung der Aminosäuren erfolgte mit dem Programm PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.1 Schrödinger, LLC). Die Kohlenstoffatome des Glutamats wurden rosa während die Kohlenstoffe des Proteins aus der pdb Datenbank in weiß gefärbt wurden. Stickstoff- und Sauerstoffatome sind blau und rot dargestellt. Phosphoratome sind orange. Scharein & Groth (2011).

IV.2.4 Einfluss der Phosphorylierung auf die ETR1 – AHP1

Komplexbildung

Um zu untersuchen, welchen Einfluss der Phosphorylierungsstatus auf die ETR1 – AHP1 Bindung hat, wurden in ETR1 der konservierte Aminosäurerest D659 und in AHP1 das konservierte Histidin H79 durch Alanin beziehungsweise Glutamat substituiert, was einem konstitutiv aktiven beziehungsweise inaktiven Protein entspricht. Der Transfer von Phosphorylgruppen von Aspartat zu Histidin ist typisch für das Zwei-Komponentensystem, wie zum Beispiel in der Osmoregulation in *E. coli* bei der Sensorkinase EnvZ und dem Antwortregulator-Protein OmpR. Daher wurden die Substitutionsmutanten ETR1-D659A, ETR1-D659E, AHP1-H79A und AHP1-H79E erstellt und die Bindung durch Fluoreszenzpolarisation, wie schon zuvor für die wildtypischen Proteine, analysiert.

Sowohl die Kombination aus konstitutiv aktivem ETR1 (D569E) und nicht-phosphorylierbarem AHP1 (H79A), als auch die Kombination aus nicht-phosphorylierbarem ETR1 (D659A) und dem konstitutiv aktiven AHP1 (H79E) zeigen eine Komplexbildung mit Dissoziationskonstanten von $2,6 \mu\text{M} \pm 0,4 \mu\text{M}$ beziehungsweise $3,6 \mu\text{M} \pm 0,6 \mu\text{M}$, die dem K_d -Wert bei Wechselwirkung der beiden wildtypischen Proteine mit $1,4 \mu\text{M}$ nahezu entsprechen. Für die niedrige Bindungskonstante der wildtypischen Proteine kann vermutet werden, dass eines der Proteine nach der Reinigung in einem phosphorylierten Status oder beide Proteine in einem teil-phosphorylierten Zustand vorliegen.

Durch die denaturierende Reinigung von ETR1 und anschließendem Renaturieren liegt ETR1 wahrscheinlich unphosphoryliert vor, während das nativ gereinigte AHP1 noch eine Phosphorylierung aus dem Expressionswirt *E. coli* tragen kann.

Für HPt-Proteine ist bekannt, dass sie in anderen Organismen als Substrat für andere Zwei-Komponenten-Systeme fungieren können, wie im Beispiel des HPt-Protein YPD1 aus *S. cerevisiae*, welches durch den Antwortregulator CheY aus *E. coli* als Substrat erkannt und phosphoryliert wird (Janiak-Spens *et al.*, 1999).

Im Gegensatz zu den teil-phosphorylierten Kombinationen zeigt sich eine Erhöhung der Dissoziationskonstante um das 11-fache für die Kombinationen aus nicht-phosphorylierbarem ETR1 (D659A) und dem nicht-phosphorylierbarem AHP1 (H79A) mit einem K_d von $15,4 \mu\text{M} \pm 3,3 \mu\text{M}$ beziehungsweise der umgekehrten Variante aus konstitutiv aktivem ETR1 (D659E) und dem konstitutiv aktiven AHP1 (H79E) mit einem K_d von $16,3 \mu\text{M} \pm 1,7 \mu\text{M}$. Dieser Wert entspricht der Dissoziationskonstante, die für andere Zwei-Komponenten-Systeme gefunden wurde, zum Beispiel für die Chemotaxisproteine CheA – CheW aus *E. coli* mit einem K_d -Wert von $17 \mu\text{M}$ (Gegner & Dahlquist, 1991). Die Bindung zwischen ETR1 und AHP1 wird demnach durch Phosphorylierung von beiden Interaktionspartnern und durch Fehlen einer Phosphorylierung an ETR1 und AHP deutlich geschwächt.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Änderung des Phosphorylierungstatus von ETR1 und AHP1 einen starken Einfluss auf die Affinität dieser Protein-Protein Interaktion hat.

IV.2.5 Analyse des ETR1 – AHP1 Komplex in Abhängigkeit von Ethylen Agonisten

Um die Frage zu klären, in wie weit die ETR1 – AHP1 Interaktion durch das Phytohormon Ethylen beeinflusst wird, wurden Fluoreszenzpolarisationsstudien unter Verwendung von Ethylen oder Ethylen-Agonisten durchgeführt. Da Kaliumcyanid (KCN) in seinem Aufbau dem Ethylen sehr ähnlich ist, wurde KCN als Agonist für diese Versuche eingesetzt. Es ist bekannt, dass KCN als Agonist für Ethylen fungieren kann und in Pflanzen zur Ethylenantwort führt (Solomos und Laties, 1974).

Ethylen ist unter natürlichen Bedingungen gasförmig und schlecht in Wasser löslich. Um trotzdem mit Ethylen in quantitativ bestimmbar Mengen arbeiten zu können, wurde die lösliche Chemikalie Ethepon verwendet, die in Wasser zu Ethylen Phosphorsäure und Chlorid hydrolysiert.

Ethepon oder KCN beeinflussen die Komplexbildung von ETR1 und AHP1 negativ. Abbildung III-10 zeigt, dass sich die Dissoziationskonstante auf 7,7 μM beziehungsweise 9 μM erhöht. Diese Werte sind 5-fach höher als im Vergleich zu der Messung ohne Liganden.

Da in der Ethylenwahrnehmung der fünf Ethylenrezeptoren der Kofaktor Kupfer von entscheidender Relevanz ist (Rodríguez *et al.*, 1999), wurde der Ethylenrezeptor mit Kupferchlorid inkubiert. Die Negativ-Kontrolle erfolgte unter Ausschluss von Kupfer. Diese Kontrolle zeigte einen, der in der Abwesenheit des Agonisten gemessenen Dissoziationskonstante, entsprechenden Wert. Die Kontrolle unterstreicht, wie wichtig Kupfer für die Bindung von Ethylen oder KCN ist und dass nicht nur der Phosphorylierungsstatus sondern auch die Ligandenbindung einen wichtigen Einfluss auf die Bildung des ETR1 - AHP1 Komplex hat.

Aus den Messungen lässt sich schlussfolgern, dass sich die Konformation der Antwortregulator-Domäne von ETR1, an die das AHP1 bindet (Scharein *et al.*, 2008), durch die Bindung von Ethylen oder den Agonisten Cyanid reguliert wird.

IV.2.6 Bestimmung des Molekulargewichts von AHP1 und AHP1-GFP^{S65T}

Die Stöchiometrie von AHP1-GFP^{S65T} in Lösung wurde bei drei unterschiedlichen Glycerin-Konzentrationen ermittelt. Die in Abwesenheit von Glycerin beobachtete geringere Steigung bei der reziproken Anisotropie bei Messwerten unterhalb von 17°C deutet auf eine Aggregatbildung von AHP1-GFP^{S65T} für Temperaturen unter 17°C hin. Durch das Abflachen der Kurve kann direkt auf eine Verlangsamung der Reaktionsgeschwindigkeit geschlossen werden. Dieses Phänomen konnte für AHP1-GFP^{S65T} bei höheren Glycerinkonzentrationen nicht beobachtet werden. Dies lässt eine stabilisierende Wirkung von Glycerin auf AHP1 vermuten, welche 2009 an dem Beispiel von *hen egg white lysozyme* (HEN) in Glycerin/Wasser Gemischen gezeigt werden konnte (Vagenende *et al.*, 2009). Dies scheint ebenfalls auf AHP1-GFP^{S65T} zutreffend zu sein.

Über die Analyse der Fluoreszenzpolarisationsdaten über den Perrin Plot konnte das Molekulargewicht für AHP1-GFP^{S65T} mit 89,9 kDa ± 1,4 kDa und für AHP1 mit 41 kDa ± 5 kDa bestimmt werden. Diese Werte sind im direkten Vergleich mit dem apparenten Molekulargewicht der Monomere von 45,6 kDa und 18,3 kDa doppelt so groß. Die gemessenen Molekulargewichte von AHP1 und den Protein-Hybrid AHP1-GFP^{S65T} zeigen, dass sowohl AHP1-GFP^{S65T} als auch AHP1 als Homodimer vorliegen.

Für die Dimer-Bildung ist das Vorhandensein von GFP^{S65T} nicht notwendig und kann somit auf das AHP1 zurückgeführt werden. Für die Dimerbildung von HPt-Proteine

finden sich in der Literatur sowohl HPT-Proteine wie YPD1 (Xu & West, 1999), ArcB (Kato *et al.*, 1997) und CheA (Zhou *et al.*, 1995) die als Monomer vorliegen, als auch das Protein Spo0B aus *Bacillus subtilis*, welches als Dimer vorliegt (Varughese *et al.*, 1998). Ein Homologie-Model von AHP1 (Programm Modeller Version 9v7, Sali & Blundell, 1993), welches aus der Kristallstruktur von QsHP1 aus *Oryza sativa* gebildet wurde, zeigt für AHP1 eine negative Oberflächenladung von Helix 3 (D40-D65) und eine positive Ladung von Helix 6 (R114-K135). Diese komplementären Ladungen können zu einer Dimerisierung des AHPs in einer Rücken-an-Rücken Orientierung führen (Scharein & Groth, 2011). In diesem Fall wäre die Interaktionsfläche mit dem konservierten Histidinrest von beiden Monomeren weiterhin zugänglich.

IV.2.7 Stöchiometrie des ETR1 – AHP1 Komplexes

Für die fünf Mitglieder der Ethylenrezeptorfamilie ist aus Versuchen in *A. thaliana* bekannt, dass ETR1 *in vivo* mit sich und den anderen Ethylenrezeptoren Homo- und Heterodimere bildet (Schaller *et al.*, 1995, Grefen *et al.*, 2008). Die ETR1 Receiver Domäne wurde ebenfalls als Homo-Dimer in Lösung und in der Kristallstruktur nachgewiesen. Die Dimerisierung erfolgt dabei über den C-Terminus über eine β -Faltblattstruktur. Diese Konformation findet sich auch in den prokaryotischen Receiver Domänen wie CheY und CheB wieder (Müller-Dieckmann *et al.*, 1999).

Die gemessene Größe eines ETR1 Dimers weicht in dieser Arbeit um etwa 110 kDa von der theoretischen Größe ab. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass es sich bei ETR1 um ein Membranprotein handelt, welches durch Zugabe eines Detergenz in Lösung gebracht wurde.

Das verwendete DDM bildet in Lösungen bei Konzentrationen oberhalb der kritischen Mizellen Konzentration (*critical micelle concentration* CMC) von

0,008% (w/v) Mizellen mit einer Größe von 72 kDa (Strop *et al.*, 2005). Bei einer eingesetzten Konzentration von 0,1% DDM im FP Messpuffer liegen demnach Mizellen vor, die an die hydrophoben Bereiche des ETR1 Proteins binden können.

Bindet eine Mizelle an ein ETR1 Monomer, so ist eine Massenzunahme von 72 kDa beziehungsweise 144 kDa für das ETR1-Dimer denkbar. Durch die Verdrängung der Transmembranhelices des Membranproteins in der Mizelle kann angenommen werden, dass die Mizellenmasse die an ein Protein gebunden ist, wahrscheinlich geringer als die Masse einer einzelnen Mizelle ist.

In Versuchen mit Lysophosphatidylcholin (LPC) mit ETR1 konnte ebenfalls eine Massenzunahme auf das Detergenz zurückgeführt werden. LPC bildet in Lösung Mizellen mit einem Molekulargewicht von 95 kDa (Perrin & Saunders 1964) und 134 kDa in Konzentrationen von 1 bis 2% (w/v) (Robinson & Saunders, 1958). ETR1 zeigt in der Gegenwart von LPC eine Massenzunahme von 125 kDa (Chen *et al.*, 2010), die Massenzunahme entspricht 141% einer einzelnen LPC-Mizelle.

Für ETR1 beträgt der Größenunterschied zwischen theoretischem und gemessenem Wert 112 kDa, was 156% einer einzelnen DDM Mizelle entspricht. Eine Größenzunahme von AHP1 unter den gleichen Pufferbedingungen mit DDM konnte nicht beobachtet werden. Die Dimerisierung von AHP1-GFP^{S65T} und die Dimerisierung von AHP1 zeigen, dass AHP1 für die Dimerisierung verantwortlich ist und nicht der GFP^{S65T} Anhang. Somit kann der Größenunterschied zwischen dem theoretischen und dem gemessenen Wert für ein ETR1 Dimer auf DDM zurückgeführt werden.

Die Größe des ETR1 – AHP1 Komplex wurde mit 347 ± 30 kDa bestimmt, was einer Größenzunahme von 65 kDa im Vergleich zu einem ETR1 Dimer entspricht. Das in der Einzelmessung mit 42 kDa bestimmte AHP1 Dimer passt zu dieser

Größenzunahme. Da AHP1 auch alleine zur Dimerisierung neigt, ist ein ETR1 – AHP1 Dimer – Dimer Komplex denkbar.

IV.2.8 Untersuchungen zu dem Antwortregulator-Protein ARR2

Die CD-Daten deuten auf ein α -helikales Protein mit Anteilen an β -Faltblattstrukturen hin, was von der sequenzbasierten Vorhersage unterstützt wird. Die Dekonvolution ergibt für den β -Kehre Anteil im Vergleich zur Vorhersage einen 15% höheren Anteil. Es muss berücksichtigt werden, dass die Genauigkeit des Vorhersageprogramms SOPMA von 69,5% nur für die Anteile an α -Helix, β -Faltblatt und Random Coil gilt. Bei der zusätzlichen Bestimmung des β -Kehre Anteils fällt die Genauigkeit auf 61,5% (Geourjon & Deleage, 1995). Vergleicht man die Daten der CD-Spektroskopie der hier analysierten Proteine miteinander, fällt auf, dass der Wert für den β -Kehre Anteil in der Vorhersage immer unter dem Wert aus der Dekonvolution liegt.

Die korrekte Faltung von ARR2 kann zudem durch die Komplexbildung von ARR2 mit AHP1 gezeigt werden. Die gemessene Dissoziationskonstante dieses Komplexes liegt mit 12,3 μ M in einem höheren Bereich als die Bindung zwischen ETR1 und AHP1. Die höhere Dissoziationskonstante wird wahrscheinlich *in vivo* durch eine höhere Konzentration von AHP1 kompensiert. *In vivo* konnte eine solche Konzentrationserhöhung in fluoreszenz-mikroskopischen Untersuchungen mit AHP1-GFP gezeigt werden, wobei sich AHP1-GFP nach Zugabe von Cytokinin im Nucleus ansammelte (Hwang & Sheen, 2001).

Die hier getesteten *in vitro* Bedingungen können im Vergleich mit den *in vivo* Bedingungen, wie sie im Nucleus vorliegen, abweichen und einen Einfluss auf die Bindungskonstante haben. Um den Einfluss der Umgebungsbedingungen

einschätzen zu können, muss die Komplexbildung in weiteren Versuchen unter veränderten pH-, Salzkonzentrations- und Viskositäts- Bedingungen analysiert werden. Weiterhin wurde der Phosphorylierungsstatus von AHP1 und ARR2 in den Experimenten bisher nicht berücksichtigt und könnten ebenfalls einen Einfluss auf die Bindung zeigen. So sind für die Chemotaxiskinase CheA und sein Antwortregulator-Protein CheY in *E. coli* Dissoziationskonstanten je nach Phosphorylierungsstatus zwischen 1 und 6,7 μM bekannt. Die unphosphorylierten Proteine CheA – CheY zeigen einen K_a -Wert von 1,0 - 1,7 μM (Steward, 1998, Li *et al.*, 1995), welcher deutlich steigt, wenn CheA phosphoryliert (2 μM) (Alon *et al.*, 1998) beziehungsweise CheY phosphoryliert (6,7 μM) vorliegt (Li *et al.*, 1995).

Über die Funktion von ARR2 ist bekannt, dass es überwiegend in Pollen exprimiert wird und im Nucleus von Pflanzenzellen lokalisiert vorliegt. Es konnte gezeigt werden, dass ARR2 an Gene von mehreren Komponenten des mitochondrialen respiratorischen Kettenkomplex I in *A. thaliana* bindet und als Transkriptionsfaktor fungiert (Lohrmann *et al.*, 2001).

Der in dieser Arbeit gefundenen Transduktionsweg von ETR1 über AHP1 zu ARR2, könnte daher für die Regulation von Blüten und der mitochondrialen Respirationskette von Bedeutung sein. Da jedoch nicht nur Ethylenrezeptoren Phosphorylgruppen auf Phosphotransfer-Proteine übertragen können, sondern auch die Cytokininrezeptoren CRE1, AHK2, AHK3, CKI1 und CKI2 sowie der Osmosensor AHK1 und der Lichtsensor PHYA-E (Oka *et al.*, 2002), könnten die Rezeptoren gemeinsam auf ARR2 wirken und die einzelnen Signaltransduktionswege über *cross-talk* durch ARR2 reguliert werden.

IV.3 Untersuchungen zur MAP Kinase CTR1

Die rekombinante Expression von CTR1 in *E. coli* anstatt in Insektenzellen (Huang *et al.*, 2003) ist ein wichtiger Durchbruch und legt die Grundlage für weitere Experimente. Die ausreichenden Mengen an CTR1 ermöglichten Experimente für eine native Reinigung.

Das SDS-Polyacrylamidgel in Abbildung III-16 zeigt die Reinheit von nativ gereinigtem CTR1. Die geringen Verunreinigungen durch Fremdprotein können vernachlässigt werden, da sich das CTR1 in einem deutlichen Überschuss befindet. Die Größe von CTR1 im SDS-Polyacrylamidgel ist kleiner als das apparente Molekulargewicht von 97,3 kDa. Die Bande wurde trotz dieser Differenz dem CTR1-Protein zugeordnet. Für manche Proteine ist ein verändertes Laufverhalten in SDS-Polyacrylamidgelen bekannt und mit der Sekundärstruktur und dem Bindeverhalten von SDS zu erklären. So konnten zum Beispiel Größenänderungen von -10% bis zu +30% für das Protein *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) auf eine einzelne Aminosäuresubstitution einer β -Kehren zurückgeführt werden (Rath *et al.*, 2009).

IV.3.1 Untersuchungen zu der Struktur von CTR1

Das gereinigte CTR1-Protein zeigt im CD Spektrum deutliche Anteile an α/β -Sekundärstrukturen, die von den berechneten Sekundärstrukturanteilen des Vorhersageprogramms SOPMA unterstützt werden. Sowohl das Vorhersageprogramm SOPMA, als auch die Auswerteprogramme CONTINLL und SELCON3 weisen für das CTR1 Protein auf einen hohen Anteil an α -Helix Strukturen von 30% und einen Anteil von 16% β -Faltblattstrukturen hin. Strukturdaten des C-terminalen Teils von CTR1 (Mayerhofer *et al.*, 2011) unterstützen diese Ergebnisse. Die Sekundärstrukturen die in der

Röntgenstrahlbeugung bestimmt werden konnten, zeigen mit 31% ebenfalls einen hohen Anteil an α -Helix Strukturen. Der Anteil an β -Faltblattstrukturen liegt mit 14% ebenfalls in der Nähe des Volllängenproteins. Für die theoretische Sekundärstrukturverteilung des C-Terminus von CTR1 berechnet das Programm SOPMA 38% α -Helix- und 14% β -Faltblatt-Anteil, was mit den Anteilen, die in der Kristallstruktur bestimmt wurden, vergleichbar ist.

IV.3.2 Untersuchungen zur Kinasaktivität von CTR1

Im Kinaseassay mit radioaktiv markiertem ATP konnte für CTR1 eine Kinaseaktivität nachgewiesen werden. Nachdem CTR1 mit radioaktiv markiertem ATP inkubiert wurde, konnte in der nachfolgenden radiographischen Analyse eine deutliche Schwärzung an der Stelle der CTR1-Bande gezeigt werden (vgl. Abbildung III-18). Die Ergebnisse der Kinaseaktivitätsmessung mit rekombinant in *E. coli* exprimierten CTR1 zeigten, dass CTR1 in einer funktionellen Konformation vorlag.

Unterstützend zu diesem Ergebnis konnte in weiteren Versuchen gezeigt werden, dass CTR1 das radioaktive Phosphat weiter auf MBP, ein für MAPKinasen typisches Substrat, übertragen konnte (vgl. Abbildung III-19). Diese Übertragung konnte für zwei unterschiedliche Puffer gezeigt werden. Diese Puffer entsprechen den Puffern die schon für das aus Insektenzellen rekombinant hergestellte CTR1 verwendet wurden (Huang *et al.*, 2003).

In den letzten beiden Spuren in Abbildung III-19 wurde MBP in Gegenwart von radioaktiv markiertem ATP aufgetragen. Das Fehlen einer Schwärzung in der Radiographie an der Position der Proteinbande zeigt, dass die radioaktive Phosphorylgruppe nur in Anwesenheit von CTR1 an MBP übertragen wird.

IV.3.3 Bestimmung der Bindungskonstante des ETR1 – CTR1

Komplexes

Im Ethylensignalweg ist CTR1 den Ethylenrezeptoren direkt nachgeschaltet und kann sowohl an ETR1 als auch an ERS1 binden, was in Hefe-Zwei-Hybrid Studien gezeigt werden konnte (Kieber *et al.*, 1993, Clark *et al.*, 1994). Eine Quantifizierung der Bindungskonstante erfolgte in diesen Studien jedoch nicht. Daher wurde das native und funktionelle CTR1 in Bindungsstudien mit ETR1 eingesetzt, um die Dissoziationskonstante des ETR1 – CTR1 Komplex zu bestimmen. Über die Messung des Tryptophanfluoreszenzquenchs nach ETR1 Zugabe, konnte für den ETR1 – CTR1 Komplex eine Dissoziationskonstante von $2,94 \mu\text{M} \pm 0,74 \mu\text{M}$ bestimmt werden. Diese Bindung zwischen ETR1 und CTR1 ist mit dem K_d -Wert von $1,4 \mu\text{M}$ des ETR1 - AHP1 Komplex vergleichbar. Für den Komplex aus CTR1-ähnlichen Proteinen, wie dem membranständigen Ras und der Serin/Threonin Kinase Raf (c-Raf-1), konnte ein vergleichbarer K_d -Wert von $1 \mu\text{M}$ bestimmt werden (Leevers *et al.*, 1994).

Die hier bestimmte Dissoziationskonstante für den ETR1 – CTR1 Komplex kann nun als Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen genutzt werden. Die Bestimmung der Dissoziationskonstante für den ERS1 – CTR1 Komplex und Versuche mit Deletionsmutanten von ETR1 ohne Antwortregulator-Domäne, können einen Einblick geben, wie CTR1 mit diesen Intaktionspartnern interagiert.

Der Einfluss des Phosphorylierungstatus auf die Dissoziationskonstante von ETR1 und CTR1 muss über Substitutionsmutanten, der an der Phosphorylierung beteiligten Aminosäuren, überprüft werden. Ein Vergleich dieser Ergebnisse, mit der nun bekannten Dissoziationskonstante für die wildtypischen Proteine, könnte Aufschluss über die Art der Inaktivierung von CTR1 durch ETR1 geben.

IV.4 Ein neues Modell für die ETR1 - AHP1 Signalübertragung

Die biochemischen Studien in dieser Arbeit zeigen, dass sich die hier getesteten ETR1 und AHP1 Proteine funktionell und strukturell wie *in planta* verhalten. Die Ergebnisse lassen eine wichtige Funktion des Phosphorylierungstatus auf den Ethylentransduktionsweg vermuten. Um die Daten in den Kontext der Ethylensignaltransduktion in *A. thaliana* zu bringen, wurde das in Abbildung IV-2 gezeigte schematische Modell erstellt, das zeigt, wie sich die Proteine unter verschiedenen Ethylenbedingungen vermutlich verhalten.

Unter Ethylenausschluss autophosphoryliert ETR1 durch seine intrinsische Kinasefunktion, woraufhin unphosphoryliertes AHP1 mit hoher Affinität an die phosphorylierte Regulator-Domäne von ETR1 binden kann. Nach der Übertragung der Phosphorylgruppe auf das Histidin in der Phosphotransfer-Domäne im AHP1, bleibt die Bindung mit gleicher Affinität bestehen, um den Transfer in den Nucleus zu dem Zielprotein ARR2 zu unterbrechen. Unter diesen Bedingungen ist die Signalkaskade ausgeschaltet.

Nach der Bindung von Ethylen von dem Ethylenrezeptor findet vermutlich eine Konformationsveränderung in der Antwortregulator-Domäne von ETR1 statt, wodurch die Dissoziationskonstante, wie die Messungen mit Cyanid und Ethephon zeigen, steigt und AHP1-P dissoziieren kann. Das lösliche AHP1-P kann nun in den Nucleus diffundieren und dort an Antwortregulator-Proteine wie ARR2 binden. Durch die Übertragung der Phosphorylgruppe wird ARR2 als Transkriptionsfaktor aktiviert und startet die Expression von relevanten Genen für die Ethylenantwort. Das unphosphorylierte AHP1 Protein kann den Zellkern wieder verlassen und erneut in den Kreislauf eintreten, wo es erneut mit phosphoryliertem ETR1 aber nicht mit unphosphoryliertem ETR1 interagieren kann.

Durch Phosphorylierungsreaktionen von anderen Histidinkinasen wie den Cytokininrezeptoren CRE1, AHK2, AHK3, CKI1 und CKI2, den Osmosensor AHK1 und den Lichtsensor PHYA-E (Oka *et al.*, 2002), kann dieser Weg aufgrund der schwachen Bindung von phosphoryliertem ETR1 und phosphoryliertem AHP1 unterbrochen werden.

Die endgültige Bedeutung des Zwei-Komponenten-Systems in der Ethylen-Signaltransduktion und der *cross-talk* mit den Transduktionswegen von Jasmonsäure (Abwehr), Auxin (Entwicklung und Wachstum) Cytokinin (Wachstum) und Abscisinsäure (Blattfall und Reifung) kann nur durch weitere Untersuchungen aufbauend auf den hier gezeigten Ergebnissen gefunden werden.

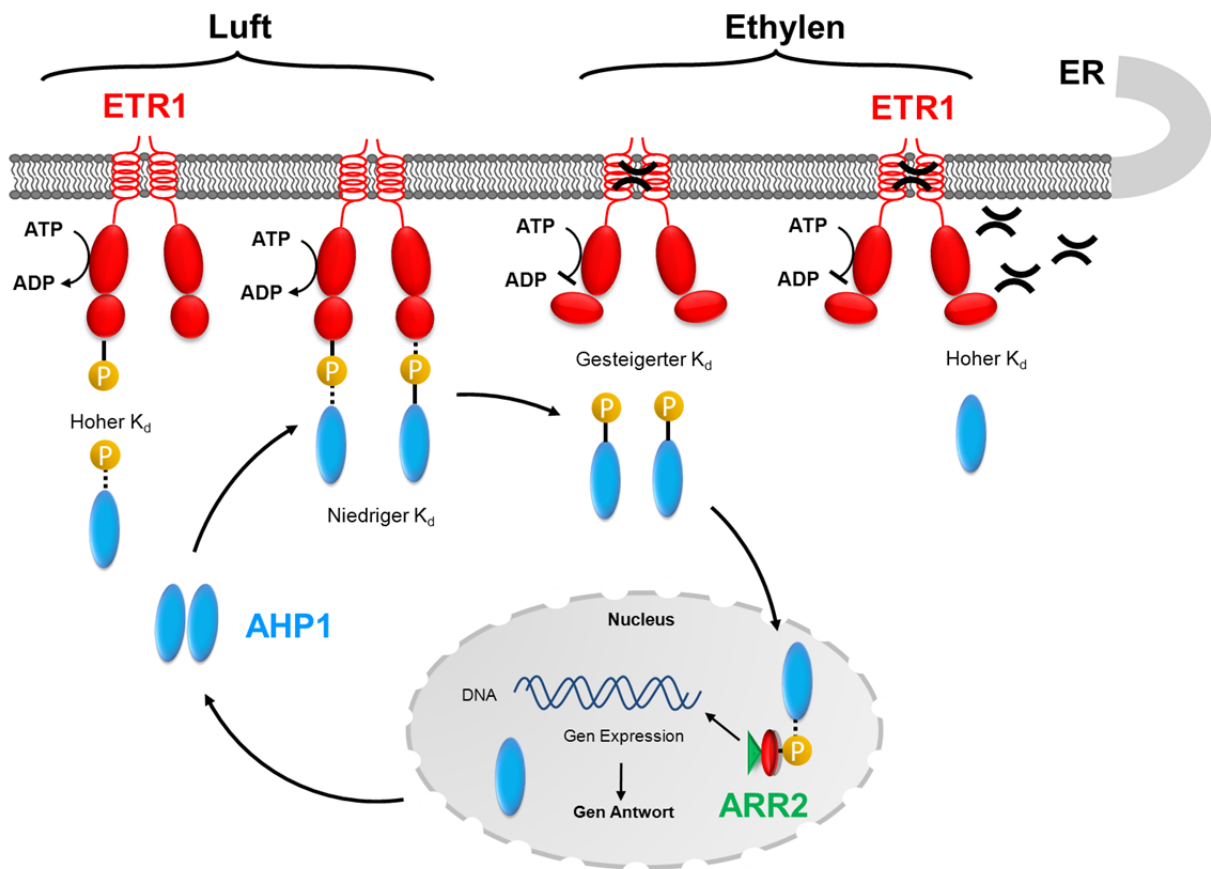


Abbildung IV-2: Schematische Darstellung der ETR1 – AHP1 Signalübertragung. Phosphoryliertes ETR1 und AHP1 zeigen einen hohen K_d . Ist eines der beiden Proteine phosphoryliert, binden die beiden Proteine mit einem niedrigen K_d . Phosphoryliertes AHP1 kann in den Nucleus eintreten und an ARR2 binden. Unphosphoryliertes AHP1 verlässt den Nucleus und kann wieder an phosphoryliertem ETR1 binden (modifiziert nach Scharein & Groth 2011).

V Zusammenfassung

In Pflanzen werden zahlreiche entwicklungsrelevante und physiologische Prozesse durch Pflanzenhormone reguliert. Das Pflanzenhormon Ethylen ist an einer Vielzahl dieser Prozesse beteiligt. Zu diesen Prozessen gehören Abszission, Seneszenz, Fruchtreifung und die Reaktion auf biotischen und abiotischen Stress.

Die an der Ethylensignalwahrnehmung und -signalweiterleitung beteiligten Komponenten konnten in genetischen Studien identifiziert werden. Zu diesen Komponenten gehören die, in der ER-Membran lokalisierten, Sensorhistidinkinasen ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 und EIN4. Nach der Ethylenwahrnehmung wird das Signal von den Ethylenrezeptoren über lösliche Proteine in den Nucleus übertragen. Die molekularen Mechanismen der Signalweiterleitung in diesem Netzwerk sind jedoch unklar.

ETR1 wird aufgrund seines strukturellen Aufbaus als Prototyp der Ethylenrezeptoren betrachtet. In dieser Arbeit wurde die Interaktion von ETR1 mit verschiedenen nachgeschalteten Komponenten über Fluoreszenzpolarisation quantifiziert.

Neben der Quantifizierung der Interaktion zwischen ETR1 mit RTE1, AHP1 und CTR1 wurden das molekulare Gewicht sowie die Stöchiometrie des ETR1-AHP1 Rezeptorkomplexes bestimmt. Wie unter *in vivo* Bedingungen konnte für ETR1 auch unter *in vitro* Bedingungen eine Dimerisierung nachgewiesen werden. Unter diesen Bedingungen bildet ETR1 mit einem AHP1-Dimer einen Dimer-Dimer Komplex.

Sowohl der Einfluss des Phosphorylierungsstatus als auch der Einfluss von Ethylen auf die Komplexbildung konnte in Fluoreszenzpolarisationsstudien charakterisiert werden. Darüber hinaus konnte die Interaktion des Ethylenrezeptors ETR1 mit dem Histidinphosphotransferprotein AHP1, sowie die Interaktion von AHP1 mit dem Transkriptionsfaktor ARR2, erstmals quantitativ analysiert werden. Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass der Ethylensignaltransfer über ein Zwei-Komponenten System erfolgt.

VI Abstract

Most physiological and developmental processes in plants are regulated by plant hormones. The plant hormone ethylene is involved in many of those processes such as abscission, senescence, fruit ripening and the reaction to abiotic or biotic stresses.

Genetic studies have identified the components taking part in ethylene perception and signal transduction. Perception of the plant hormone is mediated by a family of sensor histidine kinases named ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 and EIN4 which are localized at the ER membrane. Perception is followed by signal transfer to the nucleus by soluble proteins that interact with the receptors. The mechanism of signal transfer in this network is unclear.

The receptor ETR1 contains all motifs of a typical sensor histidine kinase and represents the prototype of the ethylene receptor family. In this thesis interactions of ETR1 with different downstream signalling components were quantified using fluorescence polarisation.

Besides quantification of protein-protein interactions of ETR1 with RTE1, AHP1 and CTR1, the molecular weight and stoichiometry of the ETR1-AHP1 receptor complex was determined. In addition dimerisation of ETR1 which is observed in the *in vivo* conditions was also demonstrated *in vitro*. At these conditions ETR1 and AHP1 form a dimer-dimer complex.

Furthermore, the impact of the phosphorylation status and of the binding of ethylene on complex formation was characterised by fluorescence polarisation studies in this work.

The studies also quantitatively characterize the interaction of the ethylene receptor ETR1 with the histidine phosphotransfer protein AHP1 and the interaction of AHP1 with the transcription factor ARR2. These data support a two-component signalling mechanism for ethylene signal transfer.

VII Literaturverzeichnis

Abeles F.B., Morgan P.W., Saltveit Jr. M.E. (1992) Ethylene in plant biology, 2nd edn. Academic Press, San Diego

Alon U., Camarena L., Surette M.G., Aguera y Arcas B., Liu Y., Leibler S., Stock J.B. (1998) Response regulator output in bacterial chemotaxis. *EMBO J.* 17(15): 4238-48.

Amemiya Y., Miyahara J. (1988) Imaging plate illuminates many fields. *Nature.* 336: 89 – 90.

Banik U., Mandal N.C., Bhattacharyya B., Roy S. (1993) A fluorescence anisotropy study of tetramer-dimer equilibrium of lambda repressor and its implication for function. *J Biol Chem.* 268(6): 3938-43.

Birnboim H.C., Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7(6): 1513-23.

Bisson M.M., Bleckmann A., Allekotte S., Groth G. (2009) EIN2, the central regulator of ethylene signalling, is localized at the ER membrane where it interacts with the ethylene receptor ETR1. *Biochem J.* 424(1): 1-6.

Bisson M.M., Groth G. (2012) Cyanide is an adequate agonist of the plant hormone ethylene for studying signalling of sensor kinase ETR1 at the molecular level. *Biochem J.* Mar 5. [Epub ahead of print]

Bleecker A.B., Esch J.J., Hall A.E., Rodríguez F.I., Binder B.M. (1998) The ethylene-receptor family from Arabidopsis: structure and function. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 353(1374): 1405-12.

Boller T. (1991) Ethylene in pathogenesis and disease resistance. In: Mattoo AK, Suttle JC, eds. The plant hormone ethylene. Boca Raton, FL: CRC Press; 293-314.

Chang C., Kwok S.F., Bleecker A.B., Meyerowitz E.M. (1993) Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. *Science.* 262(5133): 539-544.

Chen Y.F., Gao Z., Kerris R.J., Wang W., Binder B.M., Schaller G.E. (2010) Ethylene receptors function as components of high-molecular-mass protein complexes in Arabidopsis. *PLoS One.* 5(1): e8640.

Chiu W., Niwa Y., Zeng W., Hirano T., Kobayashi H., Sheen J. (1996) Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr Biol.* 6(3): 325-30.

Choi J., Huh S.U., Kojima M., Sakakibara H., Paek K.H., Hwang I. (2010) The cytokinin-activated transcription factor ARR2 promotes plant immunity via TGA3/NPR1-dependent salicylic acid signaling in Arabidopsis. *Dev Cell.* 19(2): 284-95.

Clark K.L., Larsen P.B., Wang X., Chang C. (1998) Association of the Arabidopsis CTR1 Raf-like kinase with the ETR1 and ERS ethylene receptors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95(9): 5401-6.

Corpet F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* 16(22): 10881-90.

Cousins H.H. (1910) Agricultural experiments. *Citrus Ann Rept Jamaica Dep Agric.* 1910: 7

Dong C.H., Jang M., Scharein B., Malach A., Rivarola M., Liesch J., Groth G., Hwang I., Chang C. (2010) Molecular association of the Arabidopsis ETR1 ethylene receptor and a regulator of ethylene signaling, RTE1. *J Biol Chem.* 285(52): 40706-13.

Dong C.H., Rivarola M., Resnick J.S., Maggin B.D., Chang C. (2008) Subcellular co-localization of Arabidopsis RTE1 and ETR1 supports a regulatory role for RTE1 in ETR1 ethylene signaling. *Plant J.* 53(2): 275-86.

Ecker J.R., Davis R.W. (1987) Plant defense genes are regulated by ethylene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84(15): 5202-6.

Erickson A.K., Payne D.M., Martino P.A., Rossomando A.J., Shabanowitz J., Weber M.J., Hunt D.F., Sturgill T.W. (1990) Identification by mass spectrometry of threonine 97 in bovine myelin basic protein as a specific phosphorylation site for mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 265(32): 19728-35.

Etheridge N., Chen Y.F., Schaller G.E. (2005) Dissecting the ethylene pathway of Arabidopsis. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 3(4): 372-81.

Gagne J.M., Smalle J., Gingerich D.J., Walker J.M., Yoo S.D., Yanagisawa S., Vierstra R.D. (2004) Arabidopsis EIN3-binding F-box 1 and 2 form ubiquitin-protein ligases that repress ethylene action and promote growth by directing EIN3 degradation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101(17): 6803-8.

Gane R. (1934) "Production of ethylene by some fruits". *Nature.* 134(3400): 1008

Gao R., Mukhopadhyay A., Fang F., Lynn D.G. (2006) Constitutive activation of two-component response regulators: characterization of VirG activation in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol.* 188(14): 5204-11.

Gao Z., Wen C.K., Binder B.M., Chen Y.F., Chang J., Chiang Y.H., Kerris R.J. 3rd, Chang C., Schaller G.E. (2008) Heteromeric interactions among ethylene receptors mediate signaling in *Arabidopsis*. *J Biol Chem.* 283(35): 23801-10.

Gegner J.A., Dahlquist F.W. (1991) Signal transduction in bacteria: CheW forms a reversible complex with the protein kinase CheA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88(3): 750-4.

Geourjon C., Deleage G. (1995) SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Comput Appl Biosci.* 11(6): 681-684.

Girardin J.P.L. (1864) Einfluss des Leuchtgases auf die Promenaden- und Strassenbäume. *Jahresber Agrikulturchem, Versuchssta, Berlin, 7*, 199-200.

Gray W.M. (2004) Hormonal regulation of plant growth and development. *PLoS Biol.* 2(9): E311.

Greenblatt J., Li J. (1981) Interaction of the sigma factor and the nusA gene protein of *E. coli* with RNA polymerase in the initiation-termination cycle of transcription. *Cell.* 24(2): 421-8.

Grefen C., Städele K., Růzicka K., Obrdlik P., Harter K., Horák J. (2008) Subcellular localization and in vivo interactions of the *Arabidopsis thaliana* ethylene receptor family members. *Mol Plant*. 1(2): 308-20.

Guzmán P., Ecker J.R. (1990) Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell*. 2: 513-23

Hall A.E., Chen Q.G., Findell J.L., Schaller G.E., Bleecker A.B. (1999) The relationship between ethylene binding and dominant insensitivity conferred by mutant forms of the ETR1 ethylene receptor. *Plant Physiol*. 121(1): 291-300.

Hall A.E., Findell J.L., Schaller G.E., Sisler E.C., Bleecker A.B. (2000) Ethylene perception by the ERS1 protein in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 123(4): 1449-58.

Hanahan D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. 166(4): 557-80.

Hass C., Lohrmann J., Albrecht V., Sweere U., Hummel F., Yoo S.D., Hwang I., Zhu T., Schäfer E., Kudla J., Harter K. (2004) The response regulator 2 mediates ethylene signalling and hormone signal integration in *Arabidopsis*. *EMBO J*. 2004 23(16): 3290-302.

Heim R., Cubitt A.B., Tsien R.Y. (1995) Improved green fluorescence. *Nature*. 373(6516): 663-4.

Horák J., Grefen C., Berendzen K.W., Hahn A., Stierhof Y.D., Stadelhofer B., Stahl M., Koncz C., Harter K. (2008) The *Arabidopsis thaliana* response regulator ARR22 is a putative AHP phospho-histidine phosphatase expressed in the chalaza of developing seeds. *BMC Plant Biol*. 8: 77-95.

Hsieh W.T., Matthews K.S. (1985) Lactose repressor protein modified with dansylchloride: activity effects and fluorescence properties. *Biochemistry*. 24: 3043–3049.

Hua J., Chang C., Sun Q., Meyerowitz E.M. (1995) Ethylene insensitivity conferred by Arabidopsis ERS gene. *Science*. 269(5231): 1712-1714.

Hua J., Meyerowitz E.M. (1998) Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in Arabidopsis thaliana. *Cell*. 94(2): 261-71.

Hua J., Sakai H., Nourizadeh S., Chen Q.G., Bleecker A.B., Ecker J.R., Meyerowitz E.M. (1998) EIN4 and ERS2 are members of the putative ethylene receptor gene family in Arabidopsis. *Plant Cell*. 10(8): 1321-1332.

Huang Y., Li H., Hutchison C.E., Laskey J., Kieber J.J. (2003) Biochemical and functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in Arabidopsis. *Plant J*. 33(2): 221-33.

Huffine M.E., Scholtz J.M. (1996) Energetic implications for protein phosphorylation. Conformational stability of HPr variants that mimic phosphorylated forms. *J Biol Chem*. 271(46): 28898-902.

Hwang I., Sheen J. (2001) Two-component circuitry in Arabidopsis cytokinin signal transduction. *Nature*. 413(6854): 383-9.

Jackson M.B. (2002) Long-distance signalling from roots to shoots assessed: the flooding story. *J Exp Bot*. 53(367): 175-81.

Janiak-Spens F., Sparling J.M., Gurfinkel M., West A.H. (1999) Differential stabilities of phosphorylated response regulator domains reflect functional roles of the yeast osmoregulatory SLN1 and SSK1 proteins. *J Bacteriol.* 181(2): 411-7.

Kar R.K. (2011) Plant responses to water stress: role of reactive oxygen species. *Plant Signal Behav.* 6(11): 1741-5.

Kato M., Mizuno T., Shimizu T., Hakoshima T. (1997) Insights into multistep phosphorelay from the crystal structure of the C-terminal HPt domain of ArcB. *Cell.* 88(5): 717-23.

Ke S.H., Madison E.L. (1997) Rapid and efficient site-directed mutagenesis by single-tube 'megaprimer' PCR method. *Nucleic Acids Res.* 25: 3371–3372.

Kelly S.M., Jess T.J., Price N.C. (2005) How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta.* 1751(2): 119-39.

Kende H. (1993) Ethylene biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 44: 283-307

Kieber J.J., Rothenberg M., Roman G., Feldmann K.A., Ecker J.R. (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): 427-41.

Kinoshita T., Iinuma F., Tsuji A. (1974) Microanalysis of proteins and peptides. I. Enhancement of the fluorescence intensity of dansyl amino acids and dansyl proteins in aqueous media and its application to assay of amino acids and proteins. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* (10): 2413-20.

Leevers S.J., Paterson H.F., Marshall C.J. (1994) Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature*. 369(6479): 411-4.

Li J., Swanson R.V., Simon M.I., Weis R.M. (1995) The response regulators CheB and CheY exhibit competitive binding to the kinase CheA. *Biochemistry*. 34(45): 14626-36.

Li M.Z., Elledge S.J. (2007) Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC. *Nat Methods*. 4(3): 251-6.

Lohrmann J., Sweere U., Zabaleta E., Bäurle I., Keitel C., Kozma-Bognar L., Brennicke A., Schäfer E., Kudla J., Harter K. (2001) The response regulator ARR2: a pollen-specific transcription factor involved in the expression of nuclear genes for components of mitochondrial complex I in Arabidopsis. *Mol Genet Genomics*. 265(1): 2-13.

Mason S.W., Li J., Greenblatt J. (1992) Direct interaction between two Escherichia coli transcription antitermination factors, NusB and ribosomal protein S10. *J Mol Biol*. 223(1): 55-66.

Mattison K., Kenney L.J. (2002) Phosphorylation alters the interaction of the response regulator OmpR with its sensor kinase EnvZ. *J Biol Chem*. 277(13): 11143-8.

Mattoo A.K., Suttle J.C. (1991) The plant hormone ethylene. CRC Press, Inc., Boca Raton

Mayerhofer H., Mueller-Dieckmann C., Mueller-Dieckmann J. (2011) Cloning, expression, purification and preliminary X-ray analysis of the protein kinase domain of constitutive triple response 1 (CTR1) from Arabidopsis thaliana. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 67(Pt 1): 117-20.

Miroux B., Walker J.E. (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.

Mizuno T., Suzuki T., Ueguchi C. (1999) His-Asp Phosphotransfer Signal Transducer of *Arabidopsis*. *Published Only in Pubmed Database.*

Müller-Dieckmann H.J., Grantz A.A., Kim S.H. (1999) The structure of the signal receiver domain of the *Arabidopsis thaliana* ethylene receptor ETR1. *Structure.* 7(12): 1547-56.

Moussatche P., Klee H.J. (2004) Autophosphorylation activity of the *Arabidopsis* ethylene receptor multigene family. *J Biol Chem.* 279(47): 48734-41.

Newton R., Cook W.H. (1927) The Effect of Ethylene on the Respiration of Bananas during ripening. *Plant Physiol.* 2: 357-60.

Oerke E.-C. (2006) Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science.* 144: 31–43.

Oka A., Sakai H., Iwakoshi S. (2002) His-Asp phosphorelay signal transduction in higher plants: receptors and response regulators for cytokinin signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Genet Syst.* 77(6): 383-91.

Park S.H., Raines R.T. (1997) Green fluorescent protein as a signal for protein-protein interactions. *Protein Sci.* 6(11): 2344-9.

Park S.H., Raines R.T. (2004) Fluorescence polarization assay to quantify protein-protein interactions. *Methods Mol Biol.* 261: 161–166. Review.

Pekárová B., Klumpler T., Třísková O., Horák J., Jansen S., Dopitová R., Borkovcová P., Papoušková V., Nejedlá E., Sklenář V., Marek J., Zídek L., Hejátko J., Janda L. (2011) Structure and binding specificity of the receiver domain of sensor histidine kinase CKI1 from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 67(5): 827-39.

Perez-Iratxeta C., Andrade-Navarro M.A. (2007) K2D2: estimate of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *BMC Struct Biol.* 8-25.

Perrin J.H., Saunders L. (1964) The Micellar Size and Shape of Lysolecithin. *Biochim Biophys Acta.* 84: 216-7.

Perry J., Koteva K., Wright G. (2011) Receptor domains of two-component signal transduction systems. *Mol Biosyst.* 7(5): 1388-98.

Rath A., Glibowicka M., Nadeau V.G., Chen G., Deber C.M. (2009) Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106(6): 1760-5.

Resnick J.S., Wen C.K., Shockey J.A., Chang C. (2006) REVERSION-TO-ETHYLENE SENSITIVITY1, a conserved gene that regulates ethylene receptor function in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103(20): 7917-22.

Resnick J.S., Rivarola M., Chang C. (2008) Involvement of RTE1 in conformational changes promoting ETR1 ethylene receptor signaling in *Arabidopsis*. *Plant J.* 56(3): 423-31.

Robinson N., Saunders L. (1958) The physical properties of lysolecithin and its sols. I. Solubilities, surface and interfacial tensions. *J Pharm Pharmacol.* 10(6): 384-91.

Rodríguez F.I., Esch J.J., Hall A.E., Binder B.M., Schaller G.E., Bleecker A.B. (1999) A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from Arabidopsis. *Science*. 283(5404): 996-8.

Roman G., Lubarsky B., Kieber J.J., Rothenberg M., Ecker J.R. (1995) Genetic analysis of ethylene signal transduction in Arabidopsis thaliana: five novel mutant loci integrated into a stress response pathway. *Genetics*. 139(3): 1393-409.

Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 239(4839): 487-91.

Sakai H., Hua J., Chen Q.G., Chang C., Medrano L.J., Bleecker A.B., Meyerowitz E.M. (1998) ETR2 is an ETR1-like gene involved in ethylene signaling in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95(10): 5812-5817.

Sali A., Blundell T.L. (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol*. 234(3): 779-815.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor laboratory press.

Schaller G.E., Bleecker A.B. (1995) Ethylene-binding sites generated in yeast expressing the Arabidopsis ETR1 gene. *Science*. 270(5243): 1809-11.

Schaller G.E., Ladd A.N., Lanahan M.B., Spanbauer J.M., Bleecker A.B. (1995) The ethylene response mediator ETR1 from Arabidopsis forms a disulfide-linked dimer. *J Biol Chem*. 270(21): 12526-30.

Scharein B. (2007) Charakterisierung der Wechselwirkung der Proteine der Ethylenrezeptorfamilie mit pflanzlichen Histidinphosphotransferproteinen. Diplomarbeit. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Scharein B., Voet van Vormizeele J., Harter K., Groth G. (2008) Ethylene signaling: identification of a putative ETR1-AHP1 phosphorelay complex by fluorescence spectroscopy. *Anal Biochem.* 377(1): 72-6.

Scharein B., Groth G. (2011) Phosphorylation alters the interaction of the Arabidopsis phosphotransfer protein AHP1 with its sensor kinase ETR1. *PLoS One.* 6(9): e24173.

Solomos T., Laties G.G. (1974) Similarities between the Actions of Ethylene and Cyanide in Initiating the Climacteric and Ripening of Avocados. *Plant Physiol.* 54(4): 506-11.

Sreerama N., Woody R.W. (2000) Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal Biochem.* 287(2): 252-60.

Strop P., Brunger A.T. (2005) Refractive index-based determination of detergent concentration and its application to the study of membrane proteins. *Protein Sci.* 14(8): 2207-11.

Sugawara H., Kawano Y., Hatakeyama T., Yamaya T., Kamiya N., Sakakibara H. (2005) Crystal structure of the histidine-containing phosphotransfer protein ZmHP2 from maize. *Protein Sci.* 14(1): 202-8.

Suzuki T., Sakurai K., Ueguchi C., Mizuno T. (2001) Two types of putative nuclear factors that physically interact with histidine-containing phosphotransfer (Hpt) domains, signaling mediators in His-to-Asp phosphorelay, in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 42(1): 37-45.

Swaminathan R., Hoang C.P., Verkman A.S. (1997) Photobleaching recovery and anisotropy decay of green fluorescent protein GFP-S65T in solution and cells: cytoplasmic viscosity probed by green fluorescent protein translational and rotational diffusion. *Biophys J.* 72(4): 1900-7.

Takeda K., Yoshida I., Yamamoto K. (1991) Changes of fluorescence lifetime and rotational correlation time of bovine serum albumin labeled with 1-dimethylaminonaphthalene-5-sulfonyl chloride in guanidine and thermal denaturations. *J Protein Chem.* 10(1): 17-23.

Theologis A., Ecker J.R., Palm C.J., Federspiel N.A., Kaul S., White O., Alonso J., Altafi H., Araujo R., Bowman C.L., Brooks S.Y., Buehler E., Chan A., Chao Q., Chen H., Cheuk R.F., Chin C.W., Chung M.K., Conn L., Conway A.B., Conway A.R., Creasy T.H., Dewar K., Dunn P., Etgu P., Feldblyum T.V., Feng J., Fong B., Fujii C.Y., Gill J.E., Goldsmith A.D., Haas B., Hansen N.F., Hughes B., Huizar L., Hunter J.L., Jenkins J., Johnson-Hopson C., Khan S., Khaykin E., Kim C.J., Koo H.L., Kremenetskaia I., Kurtz D.B., Kwan A., Lam B., Langin-Hooper S., Lee A., Lee J.M., Lenz C.A., Li J.H., Li Y., Lin X., Liu S.X., Liu Z.A., Luross J.S., Maiti R., Marziali A., Militscher J., Miranda M., Nguyen M., Nierman W.C., Osborne B.I., Pai G., Peterson J., Pham P.K., Rizzo M., Rooney T., Rowley D., Sakano H., Salzberg S.L., Schwartz J.R., Shinn P., Southwick A.M., Sun H., Tallon L.J., Tambunga G., Toriumi M.J., Town C.D., Utterback T., Van Aken S., Vaysberg M., Vysotskaia V.S., Walker M., Wu D., Yu G., Fraser C.M., Venter J.C., Davis R.W. (2000) Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature.* 408 (6814) 816-820.

Tournaviti S., Pietro E.S., Terjung S., Schafmeier T., Wegehangel S., Ritzerfeld J., Schulz J., Smith D.F., Pepperkok R., Nickel W. (2009) Reversible phosphorylation as a molecular switch to regulate plasma membrane targeting of acylated SH4 domain proteins. *Traffic*. 10(8): 1047-60.

Urao T., Miyata S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2000) Possible His to Asp phosphorelay signaling in an Arabidopsis two-component system. *FEBS Lett*. 478(3): 227-32.

Vagenende V., Yap M.G., Trout B.L. (2009) Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol. *Biochemistry*. 48(46): 11084-96.

Varughese K.I., Madhusudan, Zhou X.Z., Whiteley J.M., Hoch J.A. (1998) Formation of a novel four-helix bundle and molecular recognition sites by dimerization of a response regulator phosphotransferase. *Mol Cell*. 2(4): 485-93.

Vincent J.P., Lazdunski M. (1972) Trypsin-pancreatic trypsin inhibitor association. Dynamics of the interaction and role of disulfide bridges. *Biochemistry*. 11(16): 2967-77.

Voet van Vormizeele J.H. (2006) Funktionelle und molekulare Charakterisierung des Ethylenrezeptorproteins ETR1 aus *A. thaliana*. Inaugural-Dissertation. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Warne P.H., Viciano P.R., Downward J. (1993) Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro. *Nature*. 364(6435): 352-5.

Winter R., Noll F. (1998) Methoden der Biophysikalischen Chemie. B. G. Teubner-Verlag, Stuttgart, 1. Ausgabe.

Xu Q., Nguyen V., West A.H. (1999a) Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the yeast phosphorelay protein YPD1. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 55(Pt 1): 291-3.

Xu Q., West A.H. (1999b) Conservation of structure and function among histidine-containing phosphotransfer (HPt) domains as revealed by the crystal structure of YPD1. *J Mol Biol.* 292(5): 1039-50.

Yang, S.F., Hoffman, N.E. (1984). Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol.* 35: 155-189.

Yoo S.D., Cho Y.H., Tena G., Xiong Y., Sheen J. (2008) Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C₂H₄ signalling. *Nature.* 451(7180): 789-95.

Zhou H., McEvoy M.M., Lowry D.F., Swanson R.V., Simon M.I., Dahlquist F.W. (1996) Phosphotransfer and CheY-binding domains of the histidine autokinase CheA are joined by a flexible linker. *Biochemistry.* 35(2): 433-43.

Zhou M., Felder S., Rubinstein M., Hurwitz D.R., Ullrich A., Lax I., Schlessinger J. (1993) Real-time measurements of kinetics of EGF binding to soluble EGF receptor monomers and dimers support the dimerization model for receptor activation. *Biochemistry.* 32(32): 8193-8.

Zhou X., Liu Q., Xie F., Wen C.K. (2007) RTE1 is a Golgi-associated and ETR1-dependent negative regulator of ethylene responses. *Plant Physiol.* 145(1): 75-86.

VIII Anhang

VIII.1 Sequenzen

DNA Sequenz von AHP1 (*Arabidopsis histidine phosphotransfer Protein*) aus *Arabidopsis thaliana*

```
ATGGATTTGGTTCAGAAGCAGAAGAGTTTGCAAGATTACACCAAATCACTCTTCTTAGAAGGG
ATTTTGGACAGCCAGTTCTTGCAGCTGCAACAACACTACAAGATGAAAGCAATCCAGATTTTGT
TCACAAGTTGTCACTCTTCTTCCAAGACTCTGATAGGATTCTCAATGATCTCTCACTTTCC
CTAGATCAACAAGTTGTAGACTTTAAAAAAGTTGATCCCATGTTTCACTCAAAGGTAGC
AGCTCCAGTATAGGAGCACAGAGAGTTAAGAATGCTTGTGTTGTCTTCCGCAGCTTCTGCGAG
CAGCAAAATGTGCAAGCATGTCATAGATGTTTGCAACAAGTGAAGCAAGAGTATTATCTTGTG
AAAAACAGATTAGAGACTCTGTTCAAGCTGGAGCAACAGATTGTAGCTTCTGGTGGAATGATC
CCGGCCGTGCAACTCGGATTTTGA
```

DNA Sequenz von ARR2 (*Arabidopsis response regulator 2*) aus *Arabidopsis thaliana*

```
ATGGTAAATCCGGGTCACGGAAGAGGACCCGATTCCGGTACTGCTGCTGGTGGGTCAAACCTCC
GACCCGTTTCTCGCAATCTTTCGAGTTCTTGTGCTTGATGATGATCCAACCTGTCTCATGATC
TTAGAGAGGATGCTTATGACTTGTCTCTACAGAGAGCAGAGAGCGCATTGTCTCTGCTTCGGA
AGAACAAAGAATGGTTTTGATATTGTCATTAGTGATGTTTCAATATGCCTGACATGGATGGTTTC
AAGCTCCTTGAACACGTTGGTTTAGAGATGGATTTACCTGTTATCAATCTGAATGTTTTGAAA
CCTTTGGTTATAGTGATGTCTGCGGATGATTTCGAAGAGCGTTGTGTTGAAAGGAGTGACTCAC
GGTGCAGTTGATTACCTCATCAAACCGGTACGTATTGAGGCTTTGAAGAATATATGGCAACAT
GTGGTGCAGGAAGAAGCGTAACGAGTGGAATGTTTCTGAACATTCTGGAGGAAGTATTGAAGAT
ACTGGCGGTGACAGGGACAGGCAGCAGCAGCATAGGGAGGATGCTGATAACAACCTCGTCTTCA
GTTAATGAAGGAACGGGAGGAGCTCGAGGAAGCGGAAGGAAGAGGAGTAGATGATCAAGGG
GATGATAAGGAAGACTCATCGAGTTTAAAGAAACCACGCGTGGTTTGGTCTGTTGAATTGCAT
CAGCAGTTTGTGCTGCTGTGAATCAGCTAGGCGTTGACAGTGAGTTAAAAACTTGCTTGCTT
ATGCATTTGTGTGTGTCGATTGGTAACATTGTGGAATTCAGAAGTATCGGATATATCTGAGA
CGGCTTGGAGGAGTATCGCAACACCAAGGAAATATGAACCATTTCGTTTATGACTGGTCAAGAT
CAGAGTTTTGGACCTCTTCTTCGTTGAATGGATTTGATCTTCAATCTTTAGCTGTTACTGGT
CAGCTCCCTCCTCAGAGCCTTGCACAGCTTCAAGCAGCTGGTCTTGGCCGGCCTTCACTCGCT
AAACCAGGGATGTCGGTTTCTCCCTTGTAGATCAGAGAAGCATCTTCAACTTTGAAAACCA
AAAATAAGATTTGGAGACGGACATGGTTCAGACGATGAACAATGGAAATTTGCTTCATGGTGTG
CCAACGGGTAGTCACATGCGTCTGCGTCTGGACAGAATGTTTCAGAGCAGCGGAATGATGTTG
CCAGTAGCAGACCAGCTACCTCGAGGAGGACCATCGATGCTACCATCCCTCGGGCAACAGCCG
```


AGTCAGCCAGTTCCAAACAGGGCAAATAGGGAACTTGGACTTGATGGTGGATGATATGGACATC
CCGTGGTGTGATCTTAATATAAAAAGAAAAGATTGGAGCAGGTTCTTTGGCACTGTCCACCGT
GCTGAGTGGCATGGCTCGGATGTTGCTGTGAAAATTCTCATGGAGCAAGACTTCCATGCTGAG
CGTGTTAATGAGTTCCTAAGAGAGGTTGCGATAATGAAACGCCTTCGCCACCCTAACATTGTT
CTCTTCATGGGTGCGGTCACTCAACCTCCAAATTTGTCAATAGTGACAGAATATTTGTCAAGA
GGTAGTTTATACAGACTTTTGCATAAAAAGTGGAGCAAGGGAGCAATTAGATGAGAGACGTGCG
CTGAGTATGGCTTATGATGTGGCTAAGGGAATGAATTATCTTCACAATCGCAATCCTCCAATT
GTGCATAGAGATCTAAAATCTCCAACTTATTGGTTGACAAAAAATATACAGTCAAGGTTTGT
GATTTTGGTCTCTCGCGATTGAAGGCCAGCACGTTTCTTTCTCGAAGTCAGCAGCTGGAACC
CCCGAGTGGATGGCACCAGAAGTCTGCGAGATGAGCCGTCTAATGAAAAGTCAGATGTGTAC
AGCTTCGGGGTCACTCTTGTGGGAGCTTGCTACATTGCAACAACCATGGGGTAACTTAAATCCG
GCTCAGGTTGTAGCTGCGGTTGGTTTCAAGTGTAACGGCTGGAGATCCCGCGTAATCTGAAT
CCTCAGGTTGCAGCCATAATCGAGGGTTGTTGGACCAATGAGCCATGGAAGCGTCCATCATTT
GCAACTATAATGGACTTGCTAAGACCATTGATCAAATCAGCGGTTCTCCGCCAACCGCTCG
GATTTGTAA

DNA Sequenz von ETR1 (*ethylene resistant 1*) aus *Arabidopsis thaliana*

ATGGAAGTCTGCAATTGTATTGAACCGCAATGGCCAGCGGATGAATTGTTAATGAAATACCAA
TACATCTCCGATTTCTTCATTGCGATTGCGTATTTTTTCGATTCTCTTGAGTTGATTTACTTT
GTGAAGAAATCAGCCGTGTTTCCGTATAGATGGGTACTTGTTTCAAGTTTGGTGCTTTTATCGTT
CTTTGTGGAGCAACTCATCTTATTAACCTTATGGACTTTCACTACGCATTTCGAGAACCGTGGCG
CTTGTGATGACTACCGCGAAGGTGTTAACCGCTGTTGTCTCGTGTGCTACTGCGTTGATGCTT
GTTCATATATTCTGATCTTTTGAGTGTAAAGACTCGGGAGCTTTTCTTGAAAAATAAAGCT
GCTGAGCTCGATAGAGAAATGGGATTGATTGAACTCAGGAAGAAACCGGAAGGCATGTGAGA
ATGTTGACTCATGAGATTAGAAGCACTTTAGATAGACATACTATTTTAAAGACTTACTTTGTT
GAGCTTGGTAGGACATTAGCTTTGGAGGAGTGTGCATTGTGGATGCCTACTAGAACTGGGTTA
GAGCTACAGCTTTCTTATACACTTCGTATCAACATCCCGTGGAGTATACGTTTCTATTCAA
TTACCGGTGATTAACCAAGTGTTTGGTACTAGTAGGGCTGTAAAAATATCTCCTAATTCTCCT
GTGGCTAGGTTGAGACCTGTTTCTGGGAAATATATGCTAGGGGAGGTGGTTCGCTGTGAGGGTT
CCGCTTCTCCACCTTTCTAATTTTCAAGTTAATGACTGGCCTGAGCTTTCAACAAAGAGATAT
GCTTTGATGGTTTTGATGCTTCTTCAGATAGTGCAAGGCAATGGCATGTCCATGAGTTGGAA
CTCGTTGAAGTCGTCGCTGATCAGGTGGCTGTAGCTCTCTCACATGCTGCGATCCTAGAAGAG
TCGATGCGAGCTAGGGACCTTCTCATGGAGCAGAATGTTGCTCTTGATCTAGCTAGACGAGAA
GCAGAAACAGCAATCCGTGCCCGCAATGATTTCTAGCGGTTATGAACCATGAAATGCGAACA
CCGATGCATGCGATTATTGCACTCTCTTCTTACTCCAAGAAACGGAACCTAACCCCTGAACAA
AGACTGATGGTGGAAACAATACTTAAAAGTAGTAACCTTTTGGCAACTTTGATGAATGATGTC
TTAGATCTTTCAAGGTTAGAAGATGGAAGTCTTCAACTTGAACCTTGGGACATTCAATCTTCAT
ACATTATTTAGAGAGGTCCTCAATCTGATAAAGCCTATAGCGGTTGTTAAGAAATTACCCATC

ACACTAAATCTTGCACCAGATTTGCCAGAATTTGTTGTTGGGGATGAGAAACGGCTAATGCAG
ATAATATTAATATAGTTGGTAATGCTGTGAAATTTCTCCAAACAAGGTAGTATCTCCGTAACC
GCTCTTGTACCAAGTCAGACACACGAGCTGCTGACTTTTTTGTCTGCGCAACTGGGAGTCAT
TTCTACTTGAGAGTGAAGGTAAAAGACTCTGGAGCAGGAATAAATCCTCAAGACATTCCAAAG
ATTTTCACTAAATTTGCTCAAACACAATCTTTAGCGACGAGAAGCTCGGGTGGTAGTGGGCTT
GGCCTCGCCATCTCCAAGAGGTTTGTGAATCTGATGGAGGGTAACATTTGGATTGAGAGCGAT
GGTCTTGAAAAGGATGCACGGCTATCTTTGATGTTAAACTTGGGATCTCAGAACGTTCAAAC
GAATCTAAACAGTCGGGCATACCGAAAGTTCCAGCCATTCCCCGACATTCAAATTTCACTGGA
CTTAAGGTTCTTGTTCATGGATGAGAACGGGGTAAGTAGAATGGTGACGAAGGGACTTCTTGTA
CACCTTGGGTGCGAAGTGACCACGGTGAGTTCAAACGAGGAGTGTCTCCGAGTTGTGTCCCAT
GAGCACAAAGTGGTCTTCATGGACGTGTGCATGCCCGGGGTCGAAAACCTACCAAATCGCTCTC
CGTATTCACGAGAAATTCACAAAACAACGCCACCAACGGCCACTACTTGTGGCACTCAGTGGT
AACACTGACAAATCCACAAAAGAGAAATGCATGAGCTTTGGTCTAGACGGTGTGTTGCTCAA
CCCGTATCACTAGACAACATAAGAGATGTTCTGTCTGATCTTCTCGAGCCCCGGGTACTGTAC
GAGGCATGTAA

DNA Sequenz von sGFP^{S65T} (*green fluorescent protein*, sequenzoptimiert)

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGC
GACGTGAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAG
CTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACC
ACCTTCACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTC
TTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGC
AACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTG
AAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAAC
AGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATC
CGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATC
GGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAA
GACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACT
CACGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

DNA Sequenz von RTE1 (*reversion-to-ethylene sensitivity1*) aus *Arabidopsis thaliana*

ATGTCACGTGGAAGAGGAGTTCCTATGATGGACCTGAAACGAAGTTATGATGTTGAAGACAGG
GTGGTGTCCGTGTCTATAACCATCAATAATCGAAGCTGATGAGGCTGATCTGTGGCCACTACCT
GAGATTGATAACCAAGAAGTCGAAATTTCTTGCTGTATAGTTTGGACTCCTCTTCTGTTGTC
TCTTGGTTGGCTCCTTTTATTGGTTCATATTGGACTTTGCAGAGAAGATGGAGTCATTTTGGAC
TTTGCTGGATCTAACTTCATCAATGTTGATGATTTTGCATTTGGTCTCCTGCTCGCTATCTC
CAACTCGATAGAACCAAGTGTGCTTACCACCAAATATGGGTGGACATACTTGCAAGTATGGA
TTCAAACACACCGACTTTGGAACAGCGGTACATGGGATAATGCACTGAGCTCGAGCACACGT

AGCTTTGAGCATAAAACCTACAACATCTTCACTTGTAAGTCCATTCGTTTGTGCAAAGTGT
TTGAACCGTCTTTGCTATGGTGGCTCAATGGAGTGAATATGGTGAATGTTGCTATTTTACTT
ATGATCAAAGGGAAATGGATCAATGGTTCATCAGTAGTCCGCTCGTTTCTGCCATGTGCTGTG
GTCACGTCTTTGGGGTGGTGTGCTTGTGCGGCTGGCCATTCCTCATCGGTCTCTCTTCGTTCTCG
CTACTACTCTTTGCCTGGTTCATAATTGCTACTTACTGTTTTAAGAACATAATTACTTGA

VIII.2 Sequenzvergleiche

```

      10      20      30      40      50      60
|
AHP1xx0  MDLVQKQKSLQDYTKSLFLEGILDSQFLQLQQLQDESNDPFDVSVVTLFFQDSDRILND
ZmHP2x1  MAAAALREQLNALLSSMFASGLVDEQFQQLQMLQEDGGTGFVFAEVVTLFCDDADRIISE
Consensus MaaaaalreqL#allkS$FaeGi1DeQFqQLQqLQ##gn PdFVa#VVTLFc#DaDRIin#
Prim.cons. M22222222L22222S2F22G22D2QF2QLQ2LQ2222TP2FV22VVTLF22D2DRI222

7
      0 8      0 9      0 1      00 1      10 1      20
|
AHP1xx0  LSLSLDQQVVDFFKKVDPHVHQLKGSSSSIGAQRVKNACVVFRSFCEQQNVEACHRCILQQV
ZmHP2x1  LAALLDQPIVDFDKVDAYVHQLKGSSASVGAQKVKFTCMQFRQLCQDKNRDGCIMALAVV
Consensus LaalLDQq!VDFdKVDahVHQLKGSSa$!GAQrVKnaCmqFRq1C##qNr#aChraLaqV
Prim.cons. L222LDQ22VDF2KVD22VHQLKGSS2S2GAQ2VK22C22FR22C222N222C222L22V

1
      30 1      40 1      50
|
AHP1xx0  KQEYLVKNRLETLFKLEQQIVASGGMIPAVELGF
ZmHP2x1  RNEFYDLRNKFTMLQLEQQIQAQQ-----
Consensus r#E%YdlrNr1#T$1qLEQQIqAqq
Prim.cons. 22E2Y222N222T222LEQQI2A22GMIPAVELGF

```

Alignment data :

Alignment length : 155

Residues conserved for 90 % or more (upper-case letters) : 67 is 43.23 %

Residues conserved for 50 % and less than 90 % (lower-case letters) : 61 is 39.35 %

Residues conserved less than 50 % (white space) : 11 is 7.10 %

IV conserved positions (!) : 2 is 1.29 %

LM conserved positions (\$) : 2 is 1.29 %

FY conserved positions (%) : 1 is 0.65 %

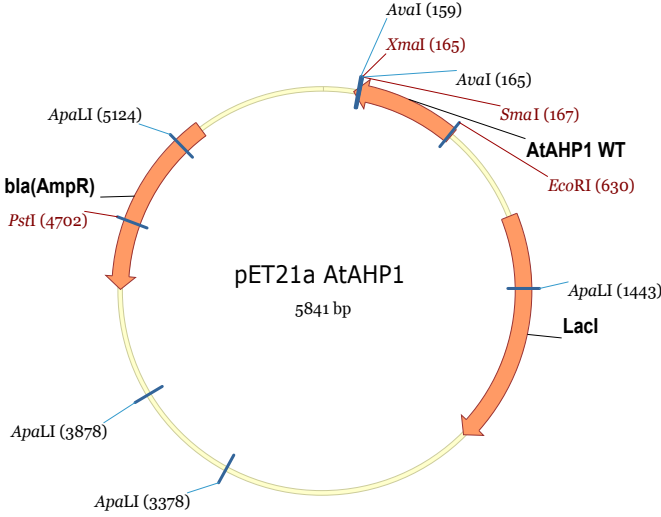
NDQEBZ conserved positions (#): 11 is 7.10 %

Sequence 0001 : AHP1xx0 (154 residues).

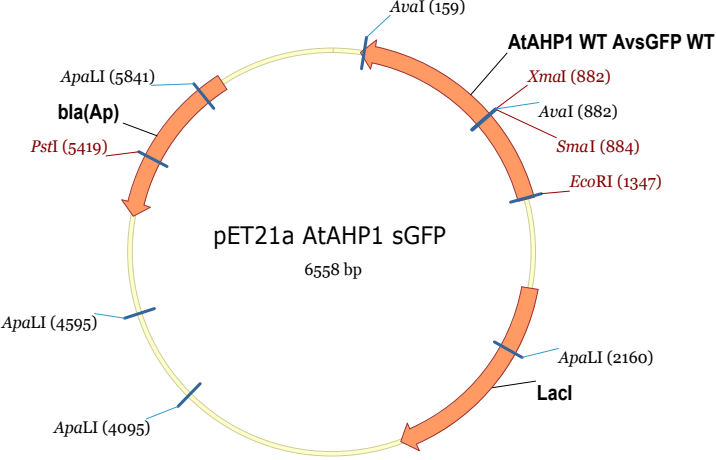
Sequence 0002 : ZmHP2x1 (145 residues).

VIII.3 Plasmidkarten

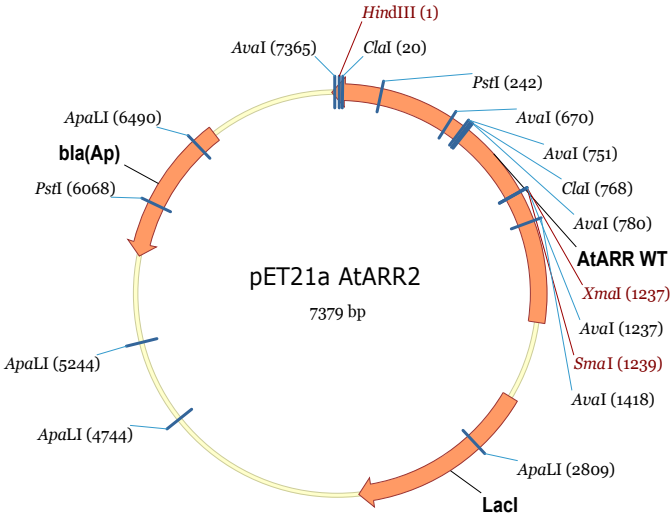
VIII.3.1 pET21a_AtAHP1



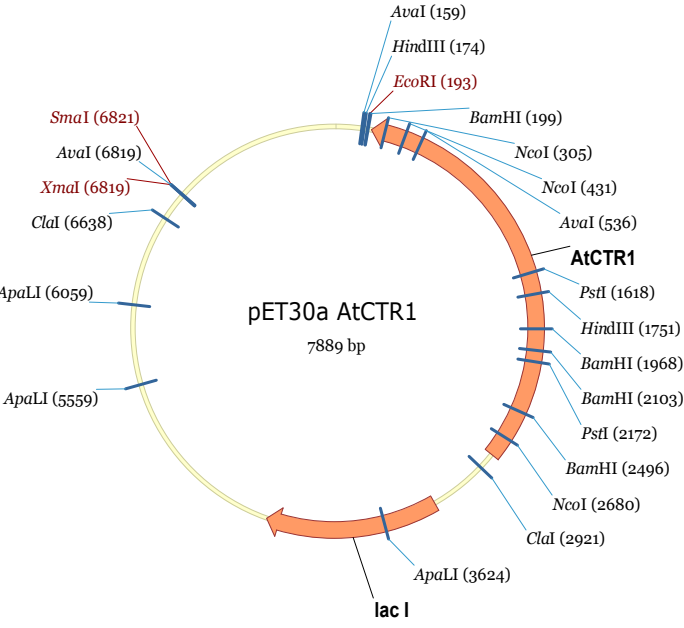
VIII.3.2 pET21a_AtAHP1_sGFP



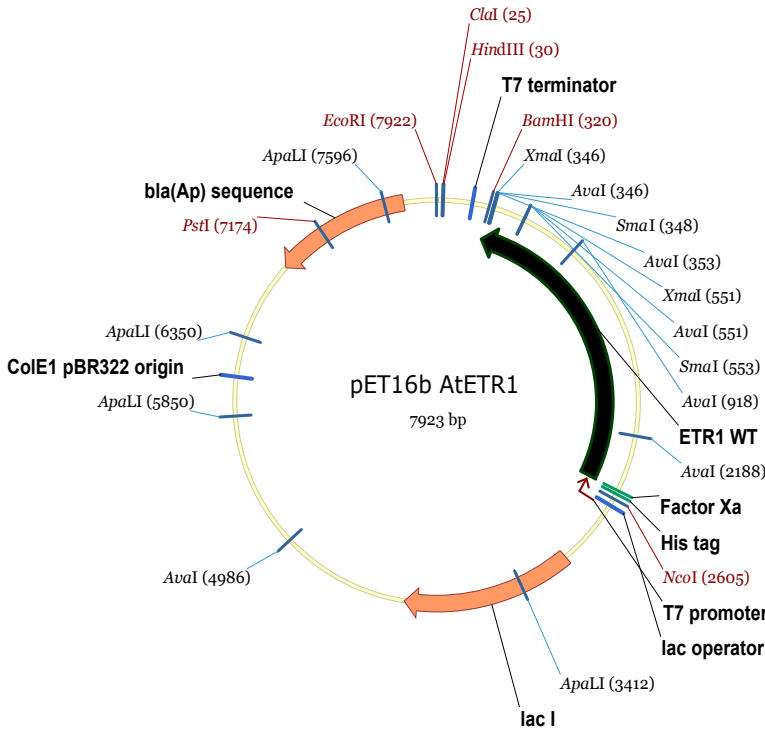
VIII.3.3 pET21a_AtARR2



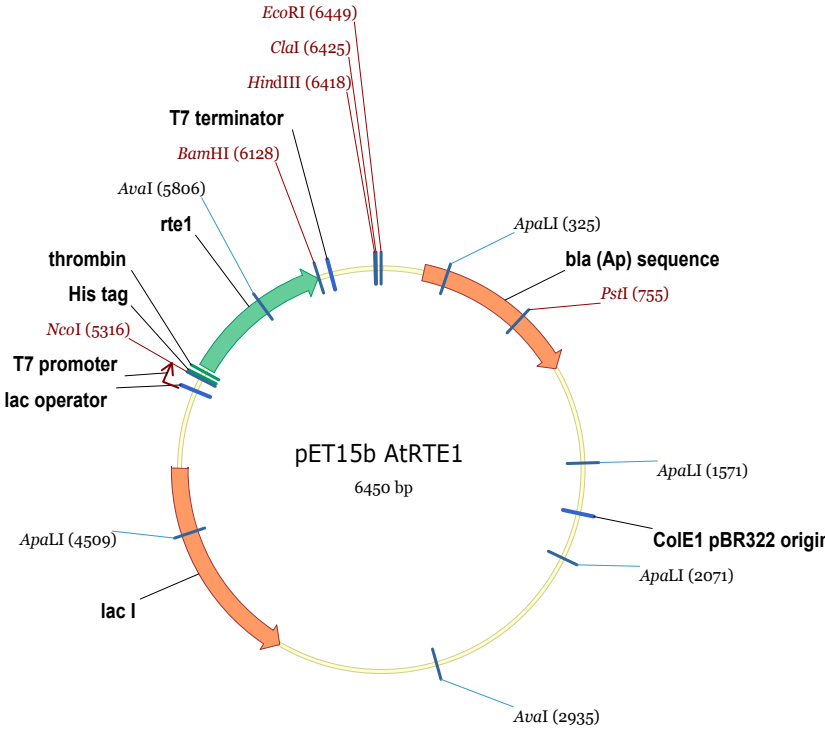
VIII.3.4 pET30a_AtCTR1



VIII.3.5 pET16b_AtETR1



VIII.3.6 pET15a_AtRTE1



IX Abkürzungen

| | |
|---------------|--|
| °C | Grad Celsius |
| A | Ampere |
| ACC | 1-Aminocyclopropan-1-Carbonsäure |
| AHP | <i>Arabidopsis histidin-containing phosphotransferprotein</i> |
| Amp | Ampicillin |
| ARR | <i>Arabidopsis response receiver</i> |
| At | Gen stammt aus <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BCA | <i>bicinchinonic acid</i> , Bicinchinonsäure |
| BisTris | Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan |
| BSA | <i>bovine serum albumin</i> , Rinder Serum Albumin |
| c | Konzentration |
| Cam | Chloramphenicol |
| CKI1/2 | <i>cytokinin independent 1/2</i> |
| CMC | <i>critical Mizelle concentration</i> , Kritische Mizellen Konzentration |
| CTR1 | <i>constitutive triple response 1</i> |
| d | Dicke |
| Da | Dalton |
| Dansylchlorid | 5-(Dimethylamino)naphthalin-1-sulfonyl- chlorid |
| DDM | n-Dodecyl- β -D-Maltopyranosid |
| DMF | N,N-Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DTT | Dithiotreitol |
| E | <i>excitation</i> , Absorption |
| E3s | Ubiquitin-Protein Ligasen |

| | |
|------------------|---|
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EIL | EIN3-like |
| EIN2/3/4 | <i>ethylene insensitive 2/3/4</i> |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| ERF | <i>ethylene respone factor</i> |
| ERS1/2 | <i>etylene re</i> |
| ETR1 | <i>ethylene resistant 1</i> |
| FOS-CHOLINE | n-Dodecylphosphocholin |
| FP | Fluoreszenzpolarisation |
| g | Gramm |
| G | <i>grating factor</i> , Gitterfaktor |
| GFP | <i>green fluorescent protein</i> |
| h | Stunde |
| H ₂ O | Wasser |
| Hz | Hertz |
| IMAC | Immobilisierte Metall Ionen Affinitäts Chromatographie |
| Kan | Kanamycin |
| KCN | Kaliumcyanid |
| K _d | Dissoziationskonstante |
| l | Liter |
| LPC | <i>Lysophosphatidylcholine</i> |
| m | Meter |
| M | Molar |
| MAP(K)(K)(K) | <i>mitogen activated protein</i> (Kinase) (Kinase) (Kinase) |
| MBP | <i>myeline basic protein</i> , Myelin Basisches Protein |
| min | Minute |
| MOPS | 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure |
| M _w | Molekulargewicht |

| | |
|-------------------|---|
| MWR | <i>mean residue weight</i> , Durchschnittliches Molekulargewicht einer Aminosäure |
| OD ₆₀₀ | Optische Dichte bei 600 nm |
| OG | <i>n-Octyl-β-D-Glucoside</i> |
| PAGE | Polyacrylamidelektrophorese |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> |
| PHYA-E | <i>phytochrome A-E</i> |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| psi | <i>pound per square inch</i> |
| RAF | <i>rapidly growing fibrosarcoma</i> |
| RTE1 | <i>reversion to ethylene sensitivity 1</i> |
| s | Sekunde, oder synthetisch in Bezug auf Gennomenklatur |
| SDS | <i>Sodium dodecyl sulfate</i> |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| Tet | Tetracyclin |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| tRNA | Transfer-Ribonukleinsäure |
| U | <i>units</i> , Einheiten |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| x g | x-fache der Erdbeschleunigung |

X Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die an mich geglaubt und mich immer unterstützt haben. Im Besonderen bedanke ich mich bei:

Prof. Dr. Georg Groth

Lieber Georg, vielen Dank für das wirklich interessante Thema, der immer offenen Tür, das offene Ohr für Probleme jeder Art, für die immer anregenden Diskussionen, für die vielen neuen Ideen, für die Möglichkeit, mich in vielen Bereichen weiter entwickeln zu dürfen, für die Unterstützung und für einfach alles.

Prof. Dr. Dieter Willbold

Vielen Dank für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Dr. Daniel Schlieper

Ich möchte Dir danken, für die langen wissenschaftlichen und manchmal auch nicht-wissenschaftlichen Gespräche. Nach dem Wegfallen der Ehemaligen war ein Loch im Institut, das Du sehr gut ausgefüllt hast. Danke für Dein immer offenes Ohr und Deine Hilfsbereitschaft.

Melanie Bisson

Mel ich kann Dir gar nicht sagen, wie verloren ich ohne Dich in den letzten Jahren gewesen wäre. Vielen Dank für Deine Unterstützung und Nachsicht mit meinen Launen. Ich werde die vielen Stunden bis in den Abend an unserem Arbeitsplatz vermissen.

Dr. Elisa Classen

Tja, was wären die vielen Jahre auf der Autobahn ohne Deine „schlafenden“ Ohren für alle Probleme in und außerhalb der Uni gewesen? Ich denke, sehr langweilig!

Judith Paulus

Die alten Bilder von uns im Ethylen-Denk-Raum machen mich immer etwas sentimental. Was waren das für schöne Zeiten mit Dir! Der Spaß und die Umarmungen werden mir fehlen. Ich danke Dir für diese schönen Jahre und Erinnerungen.

Kerstin Förster

Meine liebste Praktikantin. Ja jetzt bist Du bald der alte Hase. Mach Dir keinen Kopf. Das schaffst Du schon. Ich bin froh, dass jemand wie Du im Institut ist, der die Fahne für Recht und Ordnung hoch hält. Du bist einfach klasse. Ich will Dir danken, dass ich mich immer auf Dich verlassen konnte.

Patricia Robel

Danke für Deine Geduld und Deine Hilfsbereitschaft. Es war eine schöne Zeit, mit Dir gemeinsam zu arbeiten und über dies und das zu plaudern.

Janina Vergin

Liebe Janina, ich danke Dir für die schönen Streitgespräche und die vielen schönen Stunden mit unseren „Diskussionen“. Man findet selten Leute, mit denen man sich so gut zanken und wieder vertragen kann.

Christian Niehus & Christian Fritz

Danke für die schöne Zeit und die netten Gespräche. Auch wenn mich SC2 ne Menge Zeit gekostet hat, warte ich noch auf eine schöne Runde gegen Euch. Aber vielleicht finden wir bald mal wieder Zeit zum zocken.

Dr. Astrid Höppner

Liebe Astrid, vielen lieben Dank für Deine offene Art und Deine Hilfe bei allen Fragen über Kristalle und darüber hinaus.

Die Ehemaligen: Silke, Melli, Rafael, Erik und den Voets

Ihr ward der Grund, warum ich mich von Anfang an so wohl in unserem Institut gefühlt habe. Ich mag die Geschichten, die uns passiert sind und die Unterstützung in allen Lebenslagen, die ich von Euch erhalten hatte. Mir fehlen die aufbauenden Worte und die Stories von früher.

Prof. Dr. Hartmut Greven

Vielen Dank für Ihre unterstützenden Worte, wenn ich sie brauchte. Vielen Dank auch für das spannende Praktikum in Zusammenarbeit mit Frau Hammer.

PD Dr. Petra Reinecke

Vielen Dank für die 10 Jahre, die ich für Sie arbeiten durfte. Sie haben auf mich gebaut. Vielen Dank für Ihr Vertrauen, Ihre zuvorkommende Art und die schöne Zeit.

Danke an meine Eltern, meine Schwestern, dem Matthes (für die Philosophie) und den vielen Onkeln und Tanten aus meiner Familie, die mich ebenfalls in allen Lebenslagen unterstützt und immer an mich geglaubt haben. Danke.

Besonderer Dank geht an meine Frau Daniela und meinen Sohn Julian. Danke für Euer tiefes Verständnis und Eure bedingungslose Unterstützung. Ohne Euch, wäre ich nie so weit gekommen. Mein Herz gehört nur Euch!