Funktionelle und molekulare Charakterisierung des

Ethylenrezeptorproteins ETR1 aus A. thaliana

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

> vorgelegt von Jan Hendrik Voet van Vormizeele aus Ratingen

> > Mai 2006

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

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

Referent: Prof. Dr. G. Groth

Koreferent: Prof. Dr. K.-E. Jaeger

Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.2006

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

Düsseldorf, den 28.05.2006

meinen Eltern

Es ist nicht genug, zu wissen, man muss auch anwenden; es ist nicht genug, zu wollen, man muss auch tun. JOHANN WOLFGANG VON GOETHE

Literaturverzeichnis

I.EINLEITUNG	1
I.1 Physiologie der Ethylenwirkung	1
I.2 Meilensteine der Ethylenforschung	2
I.3 DER ETHYLEN SIGNALTRANSDUKTIONSWEG	4
I.3.1 MAP Kinasekaskade I.3.2 Zweikomponentensystem	4 4
I.4 DIE ETHYLENREZEPTORFAMILIE AUS A.THALIANA	6
I.5 Bindung von Ethylen erfolgt in der Membrandomäne	8
I.6 Die Autokinaseaktivität der Rezeptoren	10
I.6.1 Histidinkinaseaktivität und Antwortregulator des ETR1 Proteins	10
I.6.2 Serin / Threonin Kinaseaktivität versus Histidinkinaseaktivität	10
I.6.3 Ist die Serin / Threonin Aktivität eine evolutionäre Entwicklung ?	11
I.7 Zusammenspiel der Ethylenrezeptoren – Bedeutung der Histidinkinase	11
I.8 Über welchen Weg läuft die Signaltransduktion ? – Interaktionspartner –	13
I.9 Zielsetzung der Arbeit:	14
II MATERIAL UND METHODEN	15
II.1 MATERIAL	15
II.1.1 Geräte	15
II.1.2 Verbrauchs- und Chromatographiematerialien	15
II.1.3 Chemikalien und Detergenzien	16
II.1.4 Antikörper	16
II.1.5 Bakterienstämme	17
II.1.6 Vektoren	17

II.2 Molekularbiologische Methoden	18
II.2.1 Nährmedien zur Anzucht von E. coli	18
II.2.2 Transformation von E. coli Kulturen	18
II.2.3 Isolierung von Plasmid DNA	19
II.2.4 Präzipitation mit Ethanol	19
II.2.5 Konzentrationsbestimmung von DNA	20
II.2.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	20
II.2.7 Auftrennung von DNA in Agarosegelen	20
II.2.8 Alkalische Phosphatasebehandlung	21
II.2.9 Ligation	21
II.2.10 DNA-Amplifikation über Polymerase-Ketten-Reaktion	22
II.2.11 Substitutionsmutagenese des ETR1 Proteins	22
II.2.12 Klonierung der Vektoren pETR1, pETR1 ₁₋₆₀₉ und pETR1 ₁₆₅₋₇₃₈	24
II.3 BIOCHEMISCHE METHODEN	24
II.3.1 Proteinbestimmung	24
II.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	25
II.3.3 Silberfärbung	26
II.3.4 Western Blot Analyse	27
II.3.5 Dimerisierungsexperimente	29
II.3.6 Bestimmung des isoelektrischen Punktes	30
II.3.7 Massenspektrometrische Analyse	30
II.3.8 Experimente zur Histidinkinaseaktivität	30
II. 4 Zirkular Dichroismus- (CD-) Spektroskopie	32
II.4.1 Messprinzip und Datenverarbeitung [67-69]	32
II.4.2 Computerauswertung der CD Daten	34
II.5 PROTEINPRÄPARATION	34
II.5.1 Expression der Proteine ETR1, ETR1 ₁₋₆₀₉ und ETR1 ₁₆₅₋₇₃₈	35
II.5.2 Aufschluss und Solubilisation der Proteine ETR1 und ETR1 ₁₋₆₀₉	35
II.5.3 Native Reinigung des ETR1 Proteins	36
II.5.4 Reinigung unter denaturierenden Bedingungen der Proteine ETR1 und ETR1 $_{1-609}$	37
II.5.5 Reinigung unter denaturierenden Bedingungen des ETR1 ₁₆₅₋₇₃₈ Proteins	38

III B	ERGEBNISTEIL
-------	--------------

	10
III.I ALLGEMEINE EINFUHRUNG	40
III.1.1 Vorstellung der Proteinreinigungsstrategie	40
III.2 Klonierungen und Proteinexpression	42
III.3 ETR1:NATIVE REINIGUNG, ERSTE UNTERSUCHUNGEN	44
III.3.1 Hydrophobe Interaktionschromatographie und Gelfiltration	44
III.3.2 Dimerisierung in vitro	47
III.3.3 Massenspektrometrische Analyse	48
III.4 ETR1, ETR1 ₁₋₆₀₉ ETR1 ₁₆₅₋₇₃₈ : Reinigung unter denaturierenden Bedingungen und Renaturierung	50
III.4.1 IMAC und Rückfaltung des ETR1 ₁₆₅₋₇₃₈ Protein	50
III.4.2 IMAC und Rückfaltung der Proteine ETR1 und ETR1 ₁₋₆₀₉	51
III.4.3 Western Blot und Bestimmung des isoelektrischen Punktes	53
III.5 Untersuchung zur Sekundärstruktur	55
III.6 Untersuchungen zur Histidinkinaseaktivität	57
III.6.1 Die Histidinkinaseaktivität ist abhängig von Mn ²⁺ -Ionen	57
III.6.2 Der Ethylenagonist Cyanid bindet in der Membrandomäne	60
III.6.3 1-Methylcyclopropen verhindert die Hemmung durch Cyanid	63
III.6.4 Welche Aminosäure wird phosphoryliert ?	63
IV DISKUSSION	66
IV.1 Proteinreinigungen	66
IV.1.1 Verunreinigung der nativen Proteinpräparation durch DnaK	66
IV.1.2 Qualität der renaturierten Proteinpräparation	69
IV.2 ETR1 Protein lässt sich in vitro dimerisieren	70
IV.3 Die Sekundärstruktur des ETR1 Proteins	71
IV.3.1 Proteinrückfaltung	71
IV.3.2 Interpretation der gemessenen CD-Spektren	72
IV.3.3 Schlussfolgerungen	73
1 v	15

40

IV.4 Untersuchungen zur Autokinaseaktivität	74
IV.4.1 Biochemische Untersuchungen sind widersprüchlich und passen nur unvollkommer in die aktuelle Vorstellung der Signalübertragung	ι 74
IV.4.2 Autokinaseaktivität in Gegenwart verschiedener Metallionen	75
IV.4.3 Die Autokinaseaktivität ist regulierbar	77
IV.4.4 Wird das Histidin 353 phosphoryliert ?	78
IV.4.5 Das Verständnis des Übertragungsmechanismus eines Ethylensignals durch die Ethylenrezeptoren steht erst am Anfang	82

V ZUSAMMENFASSUNG

84

VI ANHANG

VI.1 LITERATURVERZEICHNIS
VI.2 Aminosäuresequenzen
VI.2.1 ETR1 Protein
VI.2.2 ETR1 ₁₋₆₀₉ Protein
VI.2.3 ETR1 ₁₆₅₋₇₃₈ Protein
VI.3 Sequenzvergleiche
VI.3.1 ETR1 und ERS1
VI.3.2 ETR1 und ETR2
VI.3.3 ETR1 und EIN4
VI.3.4 ETR1 und ERS2
VI.3.5 ETR1 und PDH (Pyruvat Dehydrogenase Kinase)
VI.3.6 ETR1 und BCK (branched-chain-α-Ketoacid-dehydrogenasekinase)
VI.4 MASSENSPEKTROMETRISCHE ANALYSE

VII DANKSAGUNG

I.Einleitung

Phytohormone spielen in Pflanzen sowohl bei der Wahrnehmung von Umweltreizen als auch bei der Steuerung von Stoffwechsel- und Entwicklungsprozessen eine entscheidende Rolle. Die spezifische und in der Regel zellübergreifende Wirkung dieser niedermolekularen und in geringen Konzentrationen wirksamen Stoffe wird durch die selektive Bindung an Rezeptoren ausgelöst. Man kennt bis heute insgesamt neun Gruppen an Phytohormonen, wobei Auxin, Giberelline, Cytokinine, Abscisinsäure und Ethylen zu den fünf ,klassischen' Vertretern zählen [1].

I.1 Physiologie der Ethylenwirkung

Die Wirkungsweise des endogenen Phytohormons Ethylen ist überaus vielfältig und betrifft physiologische Prozesse in allen Abschnitten des pflanzlichen Lebenszyklus. Dazu zählen vor allem die Förderung und Beschleunigung von agrarökonomisch interessanten Prozessen wie die Kontrolle der Fruchtreifung, dem Blattfall oder weiteren Seneszenzen [2]. Ethylen ist ebenfalls stark involviert in Wachstums- und Entwicklungsprozesse, wie die Blütenentwicklung, die Regulation der Zellerweiterung und die Ausbildung des Apikalhakens bei im Dunkeln angezogenen Keimlingen, der das Apikalmeristem schützt, wenn Keimlinge ihren Weg durch die Erde zum Licht suchen. Die phänotypische Ausprägung der Keimlinge im Dunkeln bei Begasung mit Ethylen, die auch als triple response bekannt ist (Umstellung auf horizontales Wachstum, Reduktion des Längenwachstums und Steigerung des Dickenwachstums des Hypokotyls) wurde für einen genetischen Ansatz genutzt, mit dem viele Komponenten des Ethylen Signaltransduktionsweges identifiziert wurden [2]. Ein weiterer großer Bereich, in dem Ethylen eine Rolle spielt, betrifft die Vermittlung von Stresssignalen. Fast alle durch biotische oder abiotische Faktoren verursachten Stressbedingungen induzieren die Ethylenbiosynthese. Die Signalübertragungswege von Ethylen sind vielfach mit denen anderer Phytohormone verknüpft und führen zu einem komplexen und weitreichenden Wirkungsnetzwerk [2,3].

I.2 Meilensteine der Ethylenforschung

Den Einfluss von Ethylen auf pflanzliche Entwicklungsprozesse erkannte man schon im ausgehenden 19. Jahrhundert. 1934 konnte erstmals von Gane nachgewiesen werden, dass der einfachste ungesättigte Kohlenwasserstoff ein Produkt des pflanzlichen Stoffwechsels ist [2,4]. Die Einführung gaschromatographischer Verfahren erlaubten zuverlässige Messungen niedriger Ethylenkonzentrationen bis zu 5 nl Ethylen / 1 [5,6]. Damit boten sich nach 1960 ganz neue Möglichkeiten der Erforschung des Stoffwechsels und der biologischen Aktivität des Ethylens. So konnte in den folgenden zwei Jahrzehnten die Ethylenbiosynthese weitestgehend aufgeklärt werden. Ausgangspunkt ist die Aminosäure Methionin. Durch die Umsetzung mit ATP entsteht in zwei Reaktionsschritten Aminocyclopropan-1carboxylsäure (ACC), aus der durch die ACC Oxidase Ethylen freigesetzt wird. Die Steuerung der Ethylenbiosynthese erfolgt nach heutigem Kenntnisstand vor allem über die Regulation der ACC-Synthase [4].

Das gasförmige Ethylen kann sich durch Diffusion schnell verbreiten und ist bereits in nanomolaren Konzentrationen physiologisch wirksam [2]. Bereits um 1979 entdeckte man, dass in pflanzlichen Geweben absättigbare Bindungsstellen für Ethylen existieren [7,8]. Aber erst Ende der 80er /Anfang der 90er Jahre des vergangenen Jahrhunderts gelang es durch die Etablierung eines genetischen Testsystems die molekularen Komponenten in der Signalerkennung des Ethylens zu identifizieren [9,10]. Mit einem auf der *triple response* basierenden Auswahlverfahren charakterisierte man bei *Arabidopsis thaliana* Mutanten, die gegenüber Ethylen insensitiv waren, und Mutanten, die eine konstitutive *triple response* zeigten. Die genetische Analyse dieser Mutanten und die Charakterisierung der betroffenen Gene führten zu der in Abbildung 1-1 dargestellten Vorstellung über die Ethylensignalübermittlung.

Abbildung 1-1:



Modell der Signaltransduktion des Ethylensignals

In Abbildung 1-1A sind die bisher aufgrund genetischer Experimente identifizierten Komponenten der Ethylen Signaltransduktion schematisch aufgeführt.

Abbildung 1-1B zeigt ebenfalls den Ethylen Signaltransduktionsweg. Den bisher in biochemischen Untersuchungen näher charakterisierten Komponenten ist ihre mögliche Funktion zugeordnet. Ein alternativer Weg besteht mit dem Mechanismus des Zweikomponentensystems z.B. über die Proteine AHP1, AHP2, AHP3 und ARR2.

(Abbildungen verändert nach Referenz 4)

I.3 Der Ethylen Signaltransduktionsweg

I.3.1 MAP Kinasekaskade

Ethylen wird in Pflanzen von einer Familie von membranassoziierten Rezeptorproteinen wahrgenommen. Vertreter dieser Familie sind inzwischen in vielen Pflanzen identifiziert worden, aber mit ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 und EIN4 wurden die ersten Ethylenrezeptorproteine in Arabidopsis thaliana gefunden [11-14]. Genetischen Studien zufolge führt die Bindung von Ethylen zu Inaktivierung der Rezeptoren. In Abwesenheit von Ethylen liegen die Rezeptoren vermutlich in einer aktiven Form vor, die CTR1, eine mit den Raf-Kinasen verwandte Serin/Threonin Kinase, aktiviert. CTR1 ist ebenfalls ein negativer Regulator der Signaltransduktion. Aufgrund der Verwandtschaft zu den Raf-ähnlichen MAPKK-Kinasen wird angenommen, dass CTR1 der Kopf einer solchen Kaskade sein könnte [4,15,17]. In den letzten Jahren wurden mögliche direkte und indirekte Zielproteine (SIMKK, SIMK und MPK6) identifiziert [21,22,23], aber ein genaues Bild dieser mit der Ethylen Signaltransduktion assoziierten MAP-Kinasekaskade existiert bis heute nicht [16-20].

In diesem Signaltransduktionsweg sind EIN2 und EIN3 dem CTR1 nachgeschaltet, zwei positive Regulatoren des Ethylensignalweges. EIN2 ist ein Metalltransportern ähnliches, integrales Membranprotein, dessen genaue Funktion noch ungeklärt ist [24]. EIN3 ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression von weiteren Transkriptionsfaktoren wie z.B. ERF1 kontrolliert und damit Proteine, die direkt die Expression von ethyleninduzierten Genen regulieren [4,8,16,20].

I.3.2 Zweikomponentensystem

Neben der Weitergabe des Ethylensignals durch eine MAP Kinasekaskade wird ebenso die Signalübermittlung über eine als Zweikomponentensystem bekannte Phosphatübertragungsreaktion diskutiert. Die Rezeptorproteine weisen zu Proteinen dieses Systems eine signifikante Ähnlichkeit auf [4,11,25]. Die aus Bakterien und Pilzen bekannten Zweikomponentensysteme sind auch an der Signaltransduktion in

Abbildung 1-2:



Phosphatübertragungsreaktionen in Zweikomponentensystemen

Pflanzen beteiligt. Im einfachsten Fall erfolgt die Signalweiterleitung über den Transfer einer Phosphatgruppe zwischen zwei Domänen, typischerweise von einer sensorischen Histidinkinase auf einen so genannten Antwortregulator (Abbildung 1-2A). Wird über die Sensordomäne ein Signal detektiert, so bewirkt die intrinsische Kinaseaktivität des Signalausgabebereiches die Autophosphorylierung eines Histidins, worauf die Übertragung der Phosphatgruppe auf den Aspartatrest in der Empfängerdomäne des Antwortregulators erfolgt, dessen Ausgabedomäne daraufhin seine spezifische Aktivität ändert [26-29].

In Pilzen und höheren Pflanzen kennt man eine etwas komplexere Variante, bei der das Phosphat in drei Schritten übertragen wird (Abbildung 1-2B): Die Sensorkinase besitzt im Signalausgabebereich neben der Histidinkinase einen C-terminal fusionierten Antwortregulator. Auf ein Aspartat dieser Domäne wird das Phosphat vom phosphorylierten Histidin zunächst übertragen, von diesem Aspartat dann auf das Histidin einer HPt-Domäne (*histidine-containing phosphotransmitter*) eines Transferproteins und von dort auf das Aspartat eines kernlokalisierten Antwortregulators [26-29]. Zu dieser Art Sensorkinasen, die man wegen der zusätzlichen Domäne auch Hybridkinasen nennt, weisen die Ethylenrezeptoren Sequenzhomologie auf [25].

In *Arabidopsis thaliana* sind eine Reihe dieser HPt Proteine (AHPs) und Antwortregulatoren (ARRs) gefunden worden. Einige davon (AHP1-3, ARR2) scheinen tatsächlich in die Ethylensignaltransduktion eingebunden zu sein [29-33], so dass auch dieser Weg als alternative oder zusätzliche Signalübermittlung durchaus eine Rolle spielen kann.

I.4 Die Ethylenrezeptorfamilie aus A.thaliana

Das ETR1 Rezeptorprotein aus *A. thaliana* gehört mit ETR2, ERS1, ERS2 und EIN4 [13-16] zur Familie der Ethylenrezeptorproteine. Diese fünf Ethylenrezeptoren kann man in zwei Unterfamilien einteilen: Die ETR1-ähnliche und die ETR2-ähnliche Unterfamilie (Abbildung 1-3). Ihr Aufbau umfasst im Wesentlichen vier Domänen, die entsprechend ihrer Sequenzhomologie zu bekannten Proteinmodulen benannt sind. Dazu zählen die hydrophobe Membrandomäne im N-terminalen Bereich, mit der das Protein durch drei bis vier Transmembranhelices in der Membran verankert ist, die GAF-Domäne sowie der C-terminale Signalausgabebereich mit der Histidinkinasedomäne und dem Antwortregulator.

Neben dem hochkonservierten Histidin, welches autophosphoryliert werden kann, liegen in der Histidinkinasedomäne mehrere für die Bindung von ATP notwendige Sequenzmotive (N-, G1- und G2-Box). Die Sequenzmotive der Histidinkinasen sind aber auch bei einer Vielzahl unterschiedlicher Proteine konserviert. Insbesondere die Motive der ATP bindenden Domäne finden sich z.B. auch bei Chaperonen (HSP90), DNA-bindenden Proteinen (Gyrasen, MutI) und den Dehydrogenasekinasen [34-37]. Die beiden zur Unterfamilie I gehörenden Rezeptorproteine ETR1 und ERS1 weisen untereinander 67% Sequenzidentität und 81% Ähnlichkeit auf [Anhang VI.3]. ETR1 enthält aber im Gegensatz zu ERS1 C-terminal noch den für die Hybridkinasen der Zweikomponentensysteme typischen Antwortregulator [12,17].

Die der zweiten Unterfamilie zugehörigen Proteine ETR2, EIN4 und ERS2 besitzen im Unterschied zu ETR1 und ERS1 in der Membrandomäne vier Transmembranhelices. In der Histidinkinasedomäne fehlen ein oder mehrere der für deren Aktivität wichtigen Elemente. ERS2 fehlt der Antwortregulator Empfängerdomäne [13,14,17]. Alle drei sind nicht so hoch konserviert und weisen im Vergleich zum ETR1 eine Sequenzidentität bzw. Ähnlichkeit von 38% / 62% (ETR2), 35% / 57% (ERS2) und 38% / 62% (EIN4) auf [Anhang VI.3].

Abbildung 1-3 Modularer Aufbau der Ethylenrezeptorfamilie



Schematisch dargestellt sind in Abbildung 1-3 die fünf in Arabidopsis bekannten Ethylenrezeptoren. In dieser Ansicht sind die charakterisierten Domänen entlang der Aminosäuresequenz (der N-Terminus liegt links) aufgetragen. (Abbildung aus Referenz 22)

I.5

Bindung von Ethylen erfolgt in der Membrandomäne

Das Signalmolekül Ethylen wird vermutlich in der Membrandomäne gebunden. Da Ethylen bereits in nanomolaren Konzentrationen von der Pflanze wahrgenommen werden kann, muss diese Bindestelle eine sehr hohe Affinität für das Phytohormon aufweisen [2,4]. Mit Hilfe von radioaktiven Markierungsexperimenten konnte eine solch hochaffine Bindungsstelle an Hefen, in denen ETR1 Protein exprimiert worden war, nachgewiesen und auf die ersten 128 Aminosäuren des Proteins eingegrenzt werden [38]. In weiteren Studien wurde die Ethylenbindung inzwischen auch für die Membrandomänen der anderen vier Ethylenrezeptoren gezeigt [38,39,40].

Mutagenesestudien des ETR1 Rezeptorproteins legen nahe, dass Ethylen an ein Kupfer(I) Atom bindet, welches im ETR1 durch die Aminosäuren Cystein 65 und Histidin 69 koordiniert wird [38,41,42]. Der N-terminal außerhalb der Membran gelegene Bereich besteht nur aus wenigen Aminosäuren. Essentiell in diesem kurzen N-terminalen Extramembranbereich scheinen jedoch zwei Cysteine zu sein, die an der Ausbildung eines Dimers beteiligt sind, das sowohl in *A. thaliana* als auch nach der heterologen Expression des ETR1 Proteins in Hefe nachgewiesen werden konnte [11,43]. Sowohl die an der Cu-Koordination als auch die an der Dimerisierung beteiligten Aminosäuren sind in allen fünf Rezeptorproteinen konserviert [Anhang VI.3].

Aufgrund dieser Ergebnisse und mit Hilfe von aus der Aminosäuresequenz ermittelten topologischen Voraussagen wurde ein Topologiemodell der sensorischen Domäne vorgeschlagen [4,8,25]. In diesem Modell (Abbildung 1-4) koordinieren Cys65 und His69 ein Kupfer-(I)-Ion in einer elektronenreichen hydrophoben Tasche, die durch die membrandurchspannenden Helices eines dimerisierten Rezeptors gebildet werden. In dieser Tasche kann Ethylen an das gut stabilisierte Kupfer-(I)-Ion binden. Man vermutet, dass die dabei an der Koordinationsstelle des Kupferions erfolgende Veränderung der Elektronenverteilung eine Konformationsänderung der transmembranen Helices verursacht, die letztendlich Veränderungen der C-terminalen Histidinkinasedomäne nach sich zieht [25]. Dadurch wird das Ethylensignal an die Signalausgabedomänen übertragen.

Als Verbindung zwischen dem sensorischen Membranbereich und dem C-terminalen Signalausgabebereich spielt die GAF-Domäne vermutlich eine Rolle bei der Übermittlung des Ethylensignals innerhalb des Proteins [8]. Diesem aus Phytochromen bekannten Modul konnte darüber hinaus bisher keine spezielle Funktion zugeordnet werden.

Abbildung 1-4: Modell der Ethlylenbindung

In Abbildung 1-4 dargestellt ist der hypothetischer Mechanismus der Ethylenbindung an die membranständige Bindedomäne. Bei Bindung von Ethylen kann eine Bewegung der membranständigen α -Helices über die dritte Helix an die Histidinkinasedomäne weitergegeben werden. (nach Referenz 22)



I.6 Die Autokinaseaktivität der Rezeptoren

I.6.1 Histidinkinaseaktivität und Antwortregulator des ETR1 Proteins

Die Autophosphorylierungsaktivität der Histidinkinasedomäne konnte an GST-Fusionsproteinen, die Kinase- und Antwortregulatordomäne des ETR1 Rezeptor enthielten, nachgewiesen werden. Diesen in *E. coli* exprimierten ETR1 Fragmenten fehlt die Membrandomäne des Rezeptors, so dass keine Untersuchung des Einflusses einer Ethylenbindung auf die beobachtete Aktivität möglich war. *In vitro* Phosphorylierungsexperimente deuten darauf hin, dass das konservierte Histidin 353 ausschließlich in Gegenwart von Manganionen phosphoryliert wird. Die Mutation der konservierten G2-Box führt zu inaktivem Protein [34,44,45].

Auf der C-terminalen Seite der Histidinkinase des ETR1 Proteins (AS 610-729) schließt sich eine Antwortregulatordomäne mit konserviertem Aspartatrest in Position 659 an [11]. Die Struktur dieses Bereiches konnte nach deren Kristallisation mittels Röntgenstrukturanalyse bestimmt werden. Sie deckt sich mit den bereits bekannten Strukturen prokaryotischer Antwortregulatordomänen. Sowohl in Lösung als auch im Kristall tritt diese Domäne des ETR1 als Dimer auf. Die Dissoziation dieser Komplexe in Monomere hängt möglicherweise von einer konservierten ab [46]. solche Phosphorylierung des Aspartatrestes Eine Phosphorylierung konnte jedoch bisher nicht nachgewiesen werden.

I.6.2 Serin / Threonin Kinaseaktivität versus Histidinkinaseaktivität

In den Rezeptorproteinen ETR2 und ERS2 der Unterfamilie II sind nicht alle Elemente der Histidinkinasedomäne konserviert (Abbildung 1-3). Trotzdem konnte an Fragmenten der löslichen Domänen dieser Proteine eine Autokinaseaktivität gezeigt werden, die dieser Domäne zugeordnet wurde. Der Austausch des konservierten Histidins im ERS2 gegen Alanin eliminierte diese Aktivität nicht. Es handelte sich um eine von Magnesiumionen abhängige Serin / Threonin Kinaseaktivität. Dies konnte durch Untersuchungen der Stabilität der durch die Phosphorylierung gebildeten Phosphoraminosäurebindung nachgewiesen werden [34]. Auch im ERS1 Proteinfragment wurde in diesen Experimenten ein Serin phosphoryliert. In Gegenwart von Manganionen konnte jedoch gleichzeitig eine Histidinkinaseaktivität beobachtet werden. Der Austausch des konservierten Histidins führt beim ERS1 nur zu einer deutlichen Aktivitätsabschwächung, nicht aber zur Inaktivierung der Phosphorylierung. Dies lässt vermuten, dass noch weitere Reste als Phosphorylierungsziele in Frage kommen [34].

Diese Ergebnisse wurden indirekt durch Untersuchungen an den ebenfalls zur Unterfamilie II gehörenden Ethylenrezeptorproteinen NTHK1 und NTHK2 aus Tabak bestätigt. Die löslichen Domänen dieser beiden Proteine zeigen ebenfalls unabhängig von der Gegenwart eines konservierten Histidins eine Serin / Threonin Kinaseaktivität. In NTHKL1 und NTHK2 ist diese von Manganionen abhängig und kann durch Zugabe von Magnesiumionen erhöht werden. Außerdem zeigt NTHK2 in Gegenwart von Kalziumionen trotz des fehlenden konservierten Histidinrestes zusätzlich eine Histidinkinaseaktivität [47,48]. Welche Serinreste in den verschiedenen Rezeptorproteinfragmenten phosphoryliert werden können und ob diese Phosphorylierung physiologische Relevanz besitzt, ist bis heute nicht geklärt.

I.6.3 Ist die Serin / Threonin Aktivität eine evolutionäre Entwicklung?

Es gibt in der Literatur weitere Beispiele von Proteinen, die zwar Homologie zu Histidinkinasen aufweisen, jedoch Serin / Threonin Kinaseaktivität besitzen. Beispielsweise sind in den mitochondrialen Proteinen verzweigt-kettige-α-Ketosäure-Dehydrogenasekinase und Pyruvatdehydrogenasekinase ebenfalls die für die Bindung von ATP wichtigen Sequenzmotive der Histidinkinasedomäne erhalten, obwohl die Phosphorylierungsaktivität eine andere ist [35,36]. Offensichtlich hat die Histidinkinasedomäne dieser Proteine im Verlauf der Evolution ihre spezifische Aktivität verändert, was durchaus auch auf die Ethylenrezeptorproteine zutreffen könnte.

I.7 Zusammenspiel der Ethylenrezeptoren – Bedeutung der Histidinkinase

Die fünf in *A. thaliana* identifizierten Ethylenrezeptoren scheinen in ihrer Funktion eng miteinander verknüpft zu sein. Obwohl eine Dimerisierung von ETR1 Protein *in*

vivo gezeigt wurde, konnte zwar bisher keine anderen Homo- oder Heterodimere identifiziert werden [4,16,20]. Mutationen in nur einem Ethylenrezeptorgen führen aber bereits zu einem veränderten Phänotyp. Mutanten, in denen die Ethylenbindung beeinflusst oder der Sensorbereich vom Ausgabebereich entkoppelt ist, zeigen einen dominant insensitiven Phänotyp gegenüber Ethylen. Daraus wurde abgeleitet, dass die Rezeptoren den Signalweg negativ regulieren – in Ethylenabwesenheit sind die Ethylenrezeptoren im Wildtyp also aktiv und die Zielproteine im Signalweg werden inaktiviert. Besitzt eine mutante Pflanze jedoch mindestens ein Rezeptorprotein, das kein Ethylen binden oder das Signal nicht an den C-terminalen Ausgabebereich übermitteln kann, verbleibt dieser immer in einem aktiven Zustand und deshalb sind die beschriebenen Mutationen dominant.

In wieweit die fünf Ethylenrezeptorproteine in *A. thaliana* miteinander interagieren, wurde mit Hilfe von mehreren *loss-of-function* (LOF) Mutanten weiter untersucht [49-53]. Die Elimination eines der fünf Rezeptoren zeigte keinen besonderen Phänotyp, während die Elimination mehrerer Rezeptoren zu einem Phänotyp mit einer hypersensitiven bis konstitutiven Ethylenantwort führte, je nach Anzahl oder Kombination der eliminierten Ethylenrezeptoren. Der Phänotyp der Pflanze, in der ETR1 und ERS1 gleichzeitig eliminiert wurden, war bemerkenswerterweise stärker ausgeprägt als jede andere Kombination von zwei oder sogar drei Rezeptoren. Die Ethylenrezeptoren sind damit in ihrer Funktion nicht nur redundant, sondern ETR1 und ERS1 scheint eine besonders wichtige Rolle zuzukommen [16,50].

Weil diese beiden die einzigen funktionell intakten Histidinkinasen sind, wurde versucht die in vivo Rolle dieser Domäne durch die Komplementation von ETR1-ERS1 LOF Mutanten mit modifizierten ETR1 Genen zu ergründen. Die Ergebnisse dieser Experimente sind zunächst allerdings widersprüchlich. Man beobachtete die Wiederherstellung des wildtypischen Phänotyps, als man ETR1-ERS1 LOF Mutanten mit einem ETR1 Gen mit inaktiver Kinasedomäne komplementierte [51]. Neuere Untersuchungen ergaben aber Unterschiede zu mit wildtypischem ETR1 Gen komplementierten Pflanzen. Bei niedrigen Ethylenkonzentrationen zeigten die mit ETR1 mit inaktiver Kinasedomäne komplementierten Pflanzen eine Hypersensitivität, die mit wildtypischem ETR1 komplementierten Pflanzen aber nicht [52]. Als Bestätigung dieser Ergebnisse wurde bei Untersuchungen zur Kinetik der Ethylenantwort festgestellt, dass der wildtypische Phänotyp aus einem ETR1-ERS1 LOF Phänotyp nur durch die Komplementation mit wildtypischem ETR1 nicht aber mit ETR1 mit inaktiver Kinasedomäne wiederhergestellt werden konnte [18,53,54]. Beide Experimente unterstreichen eine funktionelle Rolle der Histidinkinase bei der Signalübermittlung.

I.8 Über welchen Weg läuft die Signaltransduktion ?- Interaktionspartner -

Die Rolle und die Funktion der Histidinkinasedomäne sind bis heute unbekannt. Bisher ist lediglich klar, dass sie eine wichtige Rolle bei der Weitergabe des Ethylensignals spielt. Für diese Weitergabe kommen letztlich - wie es schon in der Abbildung 1-2B dargestellt ist - zwei Wege in Betracht, für die es die nachfolgenden Belege gibt.

Sowohl für die MAPKK Kinase CTR1 als auch für die HPt Proteine AHP1, AHP2 und AHP3 aus *A. thaliana* konnte im Zweihybridsystem der Hefe eindeutig Proteininteraktionen festgestellt werden [32,54,55]. CTR1 wurde darüber hinaus gemeinsam mit ETR1 in der ER Membran (endoplasmatisches Retikulum) lokalisiert [56,57]. Beide Proteine liegen dort nach Saccharosedichtegradienten Zentrifugationsanalysen in einem Multiproteinkomplex vor. Die Größe dieses Komplexes ist ungeklärt und die Involvierung eines AHP Proteins wäre möglich, was aber bisher nicht nachgewiesen werden konnte, genauso wenig wie eine Phosphorylierung des CTR1 Proteins durch einen Ethylenrezeptor (16,57).

Das AHP2 Protein interagiert mit dem Antwortregulator ARR2, dessen LOF Mutation genau wie bei den LOF Mutanten der Ethylenrezeptoren zu einem Ethylen insensitiven Phänotyp führt, der sich auch komplementieren lässt [29,33]. Den Mechanismus der Phosphatübertragung von einem Rezeptor über ein AHP-Protein auf einen Antwortregulator ist also durchaus denkbar, zumal ja hier Interaktionen zum ETR1 Protein nachgewiesen wurden [32]. Die Weiterleitung eines Signals des Phytohormons Cytokinin erfolgt jedenfalls über den Phosphatübertragungsmechanismus der Zweikomponentensysteme und es ist durchaus auch denkbar, dass es zwischen den Hormonsignalübertragungswegen Vernetzungen gibt [29].

I.9 Zielsetzung der Arbeit:

Zu dem ETR1 Protein gibt es bereits zahlreiche genetische Studien. Biochemische Studien wurden bisher jedoch in sehr begrenztem Umfang und nur an Fragmenten des löslichen Bereichs des Proteins durchgeführt. Ein Grund hierfür ist sicherlich die durch die Hydrophobizität der Membrandomäne verursachten Schwierigkeiten bei der heterologen Expression und bei der Reinigung. Dabei sind gerade Untersuchungen am kompletten Protein entscheidend für das Verständnis der Übermittlung eines Ethylensignals innerhalb des Proteins. Dieses Verständnis würde wahrscheinlich zu einer detaillierten Vorstellung der Signalweitergabe durch die Cterminale Histidinkinasedomäne führen.

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals Untersuchungen an gereinigtem ETR1 Rezeptorprotein durchgeführt. Insbesondere galt dabei der Fokus der Struktur der Membrandomäne, seiner funktionellen Verknüpfung mit der Histidinkinasedomäne und der Untersuchung der Aktivität der Autokinasefunktion dieser Domäne. Aufgrund der Voraussetzungen aus meiner Diplomarbeit war es möglich ETR1 heterolog in ausreichender Menge in *E. coli* zu exprimieren. Aufgabe der Doktorarbeit war es zunächst, ein Reinigungsprotokoll zu entwickeln, um das Protein in quantitativ und qualitativ ausreichenden Mengen reinigen zu können, so dass es für die geplanten strukturellen und funktionellen Untersuchungen verwendet werden konnte.

Neben funktionellen Untersuchungen Dimerisierung zur des gereinigten Rezeptorproteins wurde die Histidinkinaseaktivität des kompletten Proteins in Hinblick auf ihre Metallionenspezifität und ihre Regulierbarkeit durch Ethylenagonisten und -antagonisten, die in der Membrandomäne binden können, untersucht.

Die Sekundärstrukturanteile des ETR1 Rezeptorproteins wurden in ersten strukturellen Charakterisierungen in Zirkular Dichroismus (CD) Messungen spektroskopisch untersucht. Das Fernziel war die Untersuchung von ETR1 Proteinkristallen in Röntgenbeugungsexperimenten zur Bestimmung der Struktur.

II Material und Methoden

II.1 Material

II.1.1 Geräte

Allegra 64R Zentrifuge, Beckman – Fullerton, USA (Rotoren C650, F650) J2-21 Zentrifuge, Beckman – Fullerton, USA (Rotoren JA20, JA10) Ultrazentrifuge L870M, Beckman – Fullerton, USA (Rotoren Ti 70.1, SW55) Universal 32 RAusschwingzentrifuge – Hettich Zentrifugen, Tuttlingen 40K French Press Aufschlusszelle - Heinemann, Schwäbisch Gmünd French[®] Pressure Cell Press - Heinemann, Schwäbisch Gmünd Kulturschüttler SM30/TH30, Edmund Bühler - Deutschland Biocad 750E, Applied Biosystems - Foster, USA BioSys 2000, Beckman – Fullerton, USA DU 640 Spektralphotometer, Beckman – Fullerton, USA Spektralpolarimeter J715, Jasco Labor- & Datentechnik GmbH - Großumstadt FLA 3000, Fuji Film – Tokyo, Japan LAS 1000, Fuji Film - Tokyo, Japan

II.1.2 Verbrauchs- und Chromatographiematerialien

Amicon Ultra-15 Ultrafiltratoren, Millipore – Schwalbach Criterion IEF Gele pH 3-10 – BioRad, München Membranfilter 0,2 µm – Schleicher und Schüll, Dasul Ni-NTA-Agarose, Qiagen – Hilden PD10 Sephadex™G-25M Säulen – GE Healthcare, Uppsala, Schweden POROS®ET20, Applied Biosystems – Foster, USA Sephacryl S200-HR, Sigma Aldrich – München

II.1.3 Chemikalien und Detergenzien

 3α , 7α , 12α -Trihydroxynatriumcholat (Na-Cholat), Sigma Aldrich – München Adenosin 5'-Triphosphat (ATP), Sigma Aldrich – München Ampicillin - Natriumsalz, Sigma Aldrich – München Chloramphenicol, Sigma Aldrich – München Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), Carl Roth – Karlsruhe 1-Methylcyclopropen (MCP): SmartFreshTM 0,14% Technology, Rohm & Haas n-Dodecyl- β -maltosid, Glycon Biochemicals – Luckenwalde N-Ethylmaleimid (NEM), Sigma Aldrich – München Oligonukleotide – MWG-Biotech – Ebersberg Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Sigma Aldrich – München Tetramethylazodicarboxamide, Sigma Aldrich – München γ -³²P-ATP, Amersham Biosciences – Braunschweig

II.1.4 Antikörper

II.1.4.1 Primärantikörper

Anti- ETR1 (HRR) Antikörper

Dieser Antikörper bindet an Epitope des ETR1 Proteins innerhalb der Aminosäuren 401-738. Es handelt sich um einen polyklonalen IgG-Antikörper aus Kaninchen, der freundlicherweise von Herrn AB Bleeker, University of Wisconsin, zur Verfügung gestellt wurde. Der Antikörper wurde in einer 1 : 5000 Verdünnung eingesetzt. Die Herstellung und Bindungseigenschaften sind beschrieben in *Schaller et al* [43].

Monoclonaler IgG-mouse DnaK Antikörper, Calbiochem

Dieser Antikörper weist das Hitzeschockprotein DnaK aus E. coli nach.

IgG-mouse Tetra His Antikörper, Qiagen - Hilden

Dieser Antikörper weist eine Aminosäuresequenz von mindestens vier Histidinen nach und ist zum Nachweis von Proteinen mit Histidinankern geeignet.

II.1.4.2 Sekundärantikörper

Peroxidase labelled anti IgG-rabbit Antikörper Amersham Pharmacia Peroxidase labelled anti IgG-mouse Antikörper, Amersham Pharmacia

II.1.5 Bakterienstämme

<u>BL21 (DE3)</u>

Hierbei handelt es sich um einen Expressionsstamm (T7-RNA-Polymerase-System) der Gattung *Escherichia coli* (im weiteren *E. coli*), der von der Firma Stratagene bezogen wird. (Genotyp: *E.coli* B F⁻ dcm ompT hsdS(r_B-m_b-) *gal* (DE3))

C43 (DE3)

Dieser Stamm wurde bei der Überexpression von für BL21 (DE3) toxischen Membranproteinen identifiziert. Es handelt sich dabei um einen aus BL21 (DE3) Zellen selektierten Stamm, der eine deutlich erhöhte Effizienz bei der Expression von Membranproteinen besitzt. [58].

XL1-Blue

Zur Amplifikation von DNA wurden *E. coli* Bakterien des Stammes XL1-blue (Stratagene) verwendet. (Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB lacIq ZΔM15Tn10(Tet^r)]

II.1.6 Vektoren

<u>pET16b</u>

Hierbei handelt es sich um einen prokaryotischen Expressionsvektor der Firma Novagen, dessen T7-RNA-Polymerase Promotor genau wie die Transkription der T7-RNA-Polymerase durch IPTG induzierbar ist. Dem Transkriptionstartcodon folgen 10 Codons für Histidin (Dekahistidinanker) und die Peptidsequenz einer Thrombin Spaltungsstelle, bevor an der multiplen Klonierungsstelle (MCS) Erkennungsstellen verschiedener Restriktionsenzyme liegen. Der Vektor trägt eine Ampicillin Resistenz.

<u>p]V1</u>

Dieser Vektor enthält die komplette cDNA-Sequenz des ETR1 Rezeptorgens aus *Arabidopsis thaliana*. Das Gen ist 5' von NdeI und 3' von BamHI flankiert in die MCS des Vektors pET15b, der sich mit sechs Histidinen von dem Vektor pET16b nur in der Länge des Histidinankers unterscheidet, einkloniert. (Die Klonierung ist beschrieben in *Voet-van-Vormizeele et al* [59]). pJV1 war die Grundlage aller beschriebenen ETR1 Varianten und Substitutionsmutagenesen dieser Arbeit.

<u>pRARE</u>

Auf dem Vektor pRARE der Firma Novagen sind tRNA Gene für alle in *E. coli* selten genutzten Aminosäurecodons kodiert. Durch deren Expression wird eine Beeinträchtigung der heterologen Expression durch Häufungen solcher Codons im zu exprimierenden Gen vermieden. Dieser Vektor trägt eine Chloramphenicol Resistenz.

II.2 Molekularbiologische Methoden

Alle folgenden Methoden und Vorschriften wurden, soweit nicht anders angegeben, dem Laborbuch "Molecular cloning – a laboratory manual" [60] entnommen.

II.2.1 Nährmedien zur Anzucht von E. coli

Alle Medien wurden direkt nach ihrer Mischung in den Glasgefäßen, in denen sie verwendet worden sind, mit Alufolie abgedeckt und für 20 Minuten bei 121°C im Autoklaven sterilisiert. Vor Gebrauch wurde das für die Selektion der einzusetzenden Vektoren benötigte, sterilfiltrierte Antibiotikum in der gewünschten Endkonzentration hinzugegeben (Ampicillin: 150 μ g/ml – Chloramphenicol 34 μ g/ml) (2YT/LB-Amp/Cam). Für das Gießen von Platten wurden 15 g Agar /l zugegeben.

<u>2YT-Medium</u>	<u>LB Medium</u>
Bactotrypton 16 g/l	Bactotrypton 10 g/1
Hefeextrakt 10 g/l	Hefeextrakt 5 g/1
NaCl 5 g/l	NaCl 5 g/l
Ampicillin Stammlösung	Chloramphenicol Stammlösung
100 mg/ml sterilfiltriert	34 mg/ml

II.2.2 Transformation von E. coli Kulturen

II.2.2.1 Herstellung transformationskompetenter Zellen

E. coli vom Stamm BL21 (DE3), C41 (DE3), C43 (DE3) oder XL1Blue wurden mit der Rubidiumchlorid-Methode für die Aufnahme von Plasmid DNA kompetent gemacht. Aus einer über Nacht gewachsenen 5 ml Kultur wurden 100 ml LB Medium 1 : 100 verdünnt angeimpft und im Schüttelinkubator bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Die Zellen wurden 15 Minuten auf Eis abgekühlt und dann bei 4°C mit

2000 g in 15 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde in einem Drittel des Ausgangsvolumen RF I Lösung resuspendiert, 1 Stunde auf Eis inkubiert und erneut bei 4°C mit 2000 g für 15 Minuten abzentrifugiert. Dieses zweite Pellet wurde in einem Zehntel des Ausgangsvolumens RF II aufgenommen, resuspendiert, in 200 μ l Aliquots in flüssigem Stickstoff gefroren und bei –70°C gelagert.

<u>RF I:</u> 100 mM RbCl	<u>RF II:</u> 10 mM RbCl	\rightarrow mit NaOH auf
50 mM MnCl ₂	10 mM MOPS	pH 6,8 eingestellt
30 mM Kaliumacetat (pH 5,8)	30 mM CaCl ₂	
10 mM CaCl ₂	15 % (w/v) Glyce	erin

II.2.2.2 Transformation kompetenter Zellen

30 µl kompetente auf Eis aufgetaute Zellen wurden mit 200 ng Plasmid DNA bzw. einem halben Ligationsansatz gemischt. Nach etwa 15 Minuten Inkubation auf Eis erfolgte ein 90 sekündiger Hitzeschock bei 42°C, auf den eine sofortige Zugabe von 250 µl LB Medium folgte. Die Zellen wurden dann für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz in Aliquots auf LB-Amp Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit erhaltenen Kolonien wurden Vorkulturen (5, 100 oder 500 ml) angeimpft, die entweder für Plasmid-Präparationen (XL1Blue) oder das Animpfen von Hauptkulturen verwendet wurden.

II.2.3 Isolierung von Plasmid DNA

Plasmidpräparationen wurden mit dem *QIAprep[®] spin miniprep* Kit, Qiagen Hilden, nach Vorschrift des Herstellers und unter Verwendung der mitgelieferten Puffer durchgeführt. (QIAprep[®] Miniprep Handbuch, Juli 1999)

II.2.4 Präzipitation mit Ethanol

Das Volumen der DNA-Lösung wurde bestimmt, die Konzentration auf 0,3 M Natriumacetat eingestellt, mit zwei Volumenanteilen Ethanol p.a. versetzt und gemischt. Die Präzipitation erfolgte 20 Minuten bei –70°C. Die DNA wurde durch 10 Minuten Zentrifugation bei 12.000 x g sedimentiert. Das DNA-Präzipitat wurde getrocknet und im gewünschten Volumen des benötigten Puffers aufgenommen.

II.2.5 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die photometrische Messung von DNA erfolgte verdünnt in H₂O bei 260 nm in einer Quarzküvette gegen H₂O als Referenz. Eine $OD_{260} = 1$ entsprach einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA.

II.2.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die hier verwendeten Restriktionsendonukleasen des Typ II mit den entsprechenden Reaktionspuffern wurden von der Firma New England Biolabs (Frankfurt a.M., D) bezogen. Analytische Spaltungen wurden im 20 µl Ansatz durchgeführt, von dem 10 µl auf einem Agarosegel aufgetrennt werden. Präparative Spaltungen wurden in größeren Volumina von 50 µl durchgeführt. Diese Restriktionsansätze werden entsprechend mit den 2 ½ fachen Mengen angesetzt. Ein Ansatz wurde 2 Stunden bei 37°C inkubiert und dann im Gel (II.2.7) analysiert. Präparative Ansätze wurden entsprechend gereinigt (II.2.7). Gleichzeitige Spaltungen von DNA durch die Enzyme NdeI und BamHI wurden auf der Basis der Pufferbedingung für BamHI durchgeführt. Nach 1 Stunde Inkubation bei 37°C mit NdeI wurde zum Restriktionsansatz BamHI hinzugegeben und eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert.

analytischer Ansatz mit 300 bis 400 ng DNA:	2 μl geeigneter 10 x Puffer
	2 μl 1 mg/ml BSA
	2U Restriktionsendonuklease
	ad 20 μ l dest. H ₂ O

II.2.7 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe wurden Agarosegele verwendet. Abhängig von der Fragmentgröße betrug die Agarosekonzentration 1 oder 2 % (w/v). Die erforderliche Agarosemenge wurde in 1 x TBE aufgekocht und nach dem Abkühlen auf etwa 55°C mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 μ g/ μ l) versetzt. Die Lösung wurde in Gelträger einer Elektrophoresekammer gegossen und bei Raumtemperatur abgekühlt.

Das erstarrte Gel überschichtete man mit 1 x TBE Puffer und trug die aufzutrennenden DNA-Proben versetzt mit 10x - DNA-Auftragpuffer in die Probentaschen auf. Durch das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid wurden die DNA Fragmente unter UV-Licht als Banden sichtbar. Um die Größe der Fragmente zu bestimmen, wurde gleichzeitig 1 kB Marker (New England Biolab) aufgetrennt.

TBE Puffer	10x DNA Auftragpuffer
108 g/l TRIS/HCl, pH 8,2-8,4	50 % (v/v) Glycerin
55 g/l Borsäure	0,1 % (w/v) Bromphenolblau

Die Elektrophorese erfolgte bei 50 mA für 1 bis 2 Stunden. Zur Dokumentation wurde das Agarosegel auf dem UV-Transilluminator fotografiert. Zur Gewinnung der aufgetrennten DNA Fragmente aus den Agarosegelen wurden die Fragmente mit einem Skalpell ausgeschnitten und über *QIAquick® gel extraction* Säulchen (Qiagen) nach Herstellerangaben gereinigt (Qiagen[®] Handbuch, Juli 1999).

II.2.8 Alkalische Phosphatasebehandlung

Zur Vermeidung einer Religation von geschnittenen Vektoren in einem Ligationsansatz wurden die Phosphatgruppen am 5′ Ende mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (New England Biolabs) entfernt. Dazu wurde ein Ansatz mit 10 µg geschnittenem Vektor und 5 U alkalischer Phosphatase (CIP) in dem mitgelieferten Puffer gemischt und 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die CIP über *QIAquick® gel extraction* Säulchen (Qiagen) nach dem Herstellerprotokoll zur PCR-Produkt Reinigung aus dem DNA Ansatz entfernt.

II.2.9 Ligation

Die Ligation von DNA Fragmenten mit linearisierter Vektor DNA erfolgte in einem molaren Verhältnis von ungefähr 5 : 1 unter Verwendung der T4 DNA Ligase (New England Biolabs) und dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer. Die Ligation wurde in einem Gesamtvolumen von 10 bis 20 µl durchgeführt. Es wurden 40 U Ligase pro Ansatz verwendet und die Ligation bei 16°C für 6 bis 16 Stunden inkubiert. Der Erfolg der Ligation wurde durch Transformation des Ansatzes in den Stamm XL1Blue überprüft, aus dem dann das erfolgreich ligierte Plasmid präpariert werden konnte.

II.2.10 DNA-Amplifikation über Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine Methode, um definierte DNA-Fragmente zu amplifizieren. Grundlage für diese Technik ist die Entdeckung und Isolierung einer thermostabilen DNA-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermophilus aquaticus (Taq)* von *Saiki et al.* [61,62].

Das hier verwendete Enzym Pwo-Polymerase, das wie die verwendeten Puffer und Nukleotide von der Firma PeqLab bezogen wurde, war eine thermophile DNA-Polymerase aus dem hyperthermophilen Tiefseebakterium *Pyrococcus woesei*.

Das im Folgenden aufgeführte Pipetierschema galt für die Durchführung von PCRs unter der Verwendung von 20 bis 30 Nukleotide umfassenden Primern.

Für die Durchführung von PCRs, in denen ein 300 bis 1000 bp großes DNA Fragment als Megaprimer eingesetzt wurde, wurde das PCR Programm etwas abgewandelt. Die Anlagerungstemperatur wurde von 55°C auf 50°C gesenkt und die Dauer des Verlängerungsschrittes von 3,5 Minuten auf 5 Minuten erhöht.

Zur Gewinnung des PCR-Produktes wurde der Ansatz wie unter II.2.7 beschrieben über ein Agarosegel aufgetrennt, die Fragmente ausgeschnitten und gereinigt.

PCR-Pipettier-Schema:	PCR-Programm:
10 μl dNTP-Mix (1,25 mM)	1. Zyklus 5 min 94°C
5 μl Pwo-10x-Puffer	231. Zyklus 1 min 94°C
5 μl 3'-Primer (50 pmol)	1 min 55°C
5 μl 5'-Primer (50 pmol)	3,5 min 72°C
x μl Template (500 ng Vektor)	32. Zyklus 1 min 94°C
1 μl Pwo-Polymerase (1 U)	1 min 55°C
ad 50 µl H2O	10 min 72°C

II.2.11 Substitutionsmutagenese des ETR1 Proteins

Der gezielte Austausch bestimmter Aminosäurereste des ETR1 Proteins konnte durch zwei hintereinander geschaltete Polymerasekettenreaktionen (PCR) erreicht werden. Dabei wurde im ersten Schritt ein kleineres DNA Fragment amplifiziert, das am 3' Ende des codogenen Stranges einen über den PCR Primer eingeführten Basenaustausch trug. Dieser Basenaustausch änderte das Codon der zu substituierenden Aminosäure. Im zweiten Schritt setzte man dieses PCR Produkt als Megaprimer ein, so dass ein Fragment amplifiziert wird, welches im mittleren Bereich die eingeführte Mutation bzw. das geänderte Aminosäurecodon aufweist. Für die durchgeführten Austausche C4SC6S und H353A sind die verwendeten Primer in der nachfolgenden Tabelle 2-1 aufgeführt. Das primäre Template war pJV1. Für den Austausch C4SC6S war nur eine PCR notwendig, da die zu veränderte Stelle direkt am Anfang des Gens liegt. Der Austausch H353A wurde über einen Megaprimer durchgeführt.

Klonierung		5' PCR Primer	3' PCR Primer
C4SC6S Substitution		AGCCATATGGAAGTCTCCAAT TCTATTGAACCG	GCTAGTTATTGCTCAGCGG (T7-Terminator Primer)
	1.	AGCGGTTATGAACGCAGAAA	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
H353A	PCR	TGCGAACACC	(T7-Terminator Primer)
Substitution	2.	TAATACGACTCACTATAGGG	Magaprimar dar 1 BCP
	PCR	(T7 Promotor Primer)	Megaprimer der 1. i CK
pETR11-609		TAATACGACTCACTATAGGG	CCCGGATCCTTATCCAGTGAAAT
		(T7 Promotor Primer)	TTGAATGTC
pETR1 ₁₆₅₋₇₃₈			GCTAGTTATTGCTCAGCGG
		AGCAIAIGACIACACIIGII	(T7-Terminator Primer)

Tabelle 2-1: Verwendete PCR-Primer

Alle PCRs wurden wie in II.2.10 beschrieben durchgeführt. Die gereinigten PCR Produkte, die komplette ETR1-Gene umfassten, wurden wie in II.2.6 beschrieben mit den Restriktionsenzymen NdeI und BamHI behandelt und dann gemeinsam mit einem ebenfalls mit diesen Enzymen behandelten und dephosphorylierten Vektor pET16b (nach II.2.6 und II.2.8) in einer Ligationsreaktion (II.2.9) eingesetzt.

Die pET16b Vektoren, die die veränderten ETR1 Gene enthielten, wurden unter den Namen pETR1_{H353A} und pETR1_{C4SC6S} geführt. Die Sequenzierung der subklonierten PCR-Fragmente erfolgte durch die Firma Genterprise GmbH, Mainz.

II.2.12 Klonierung der Vektoren pETR1, pETR1₁₋₆₀₉ und pETR1₁₆₅₋₇₃₈

pETR1

Das ETR1 Gen wurde über die flankierenden Restriktionsschnittstellen NdeI und BamHI aus dem Vektor pJV1 herausgetrennt und in den Vektor pET16b eingeführt.

pETR1₁₋₆₀₉ und pETR1₁₆₅₋₇₃₈

Für die Klonierung des ETR1₁₆₅₋₇₃₈ Gens, dem im Unterschied zum ETR1 Gen die Antwortregulatordomäne fehlt, wurde ein 3' Primer ausgewählt, der nach einer BamHI Restriktionserkennungsstelle und einem komplementären Stop-Codon die komplementären Aminosäurecodons 609-604 des ETR1 Proteins aufwies.

Für die Klonierung des ETR1₁₆₅₋₇₃₈ Gens, das nur für die löslichen Domänen des ETR1 Rezeptorproteins kodiert, in den Vektor pET16b wurde ein 5' Primer ausgewählt, dem auf eine NdeI Restriktionserkennungsstelle, ergänzt von der Methionincodonsequenz die Aminosäurecodons 164-167 des ETR1 Proteins folgen.

Mit dem T7 Promotor Primer und dem ETR1₁₋₆₀₉ 3' Primer bzw. dem ETR1₁₆₅₋₇₃₈ 5' Primer und dem T7 Terminator Primer wurden nach II.2.10 PCRs durchgeführt (Tabelle 2-1). Als Matrize diente der Vektor pJV1, der das ETR1 Gen enthielt (II.1.6). Die gereinigten PCR Produkte wurde nach II.2.1.6 mit den Restriktionsenzymen NdeI und BamHI behandelt. Dann wurden diese jeweils gemeinsam mit einem ebenfalls mit den Enzymen NdeI und BamHI behandelten und anschließend dephosphorylierten Vektor pET16b (II.2.6 / II.2.8) in eine Ligationsreaktion (II.2.9) eingesetzt.

Der die Gensequenz der ETR1 Aminosäuren 1-609 enthaltende Vektor wurde unter dem Namen pETR1₁₋₆₀₉ geführt, der die Gensequenz des Bereichs der Aminosäuren 165-738 des ETR1 Proteins enthaltende Vektor unter dem Namen pETR1₁₆₅₋₇₃₈. Zur Verifizierung der korrekten DNA-Sequenz erfolgte die Sequenzierung der subklonierten PCR-Fragmente durch die Firma Genterprise GmbH, Mainz.

II.3 Biochemische Methoden

II.3.1 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mit den Reagenzien BCA-Protein Assay der Firma Pierce (Rockford, USA) oder BioRad Protein Assay der Firma BioRad (München, D). Mit dem BCA-Protein Assay wurde in der Regel die Proteinkonzentration von Proben gemessen, bei denen eine Konzentration von mehr als 5 mg/ml erwartet wurde. Insbesondere wurden die Konzentration aller Proben der nativen ETR1 Proteinreinigung und von Proben der renaturierten ETR1 und ETR1₁₋₆₀₉ Proteine mit diesem Assay bestimmt. Dazu wurden je 1000 µl der nach Herstellerangaben gemischten Testlösungen mit 1 bis 20 µl Proteinlösung bei 37°C für 20 Minuten inkubiert und photometrisch bei 562 nm gemessen. Durch die Reaktion der Bicinchoninsäure mit dem Kupfer-Protein Komplex entsteht ein rötlich, violetter Farbkomplex. Die Eichreihe mit 0 bis 20 µg BSA (Rinderserumalbumin, Pierce) wurde genauso behandelt. Niedrige Konzentrationen, insbesondere die von Proben aus CD spektroskopischen Messungen und der in 8 M Harnstoff vorliegenden Proteinproben wurden mit dem BioRad Protein Assay analysiert. Dazu wurde je 1000 µl der verdünnten Testlösung mit 1 bis 25 µl Proteinlösung 1 bis 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Bindung von Coomassie brilliant blue G-250 an die Proteine kommt es zur Blaufärbung, die bei einer Extinktion von 595 nm beobachtet werden kann. Die Proteinbestimmung erfolgte anhand einer Eichreihe von 0 bis 10 μ g BSA.

II.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteinproben der Reinigung, der Dimerisierungsexperimente und der radioaktiven Autokinaseexperimente wurden in der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli [63] analysiert.

Die diskontinuierlichen SDS-Gele bauten sich aus einem 10 oder 12 %igen (w/v) Acrylamid Trenngel und einem 5 %igen (w/v) Acrylamid Sammelgel auf. Es wurden sowohl kleine Gele (6 cm x 8 cm), die Platz für bis zu 12 Proben boten, als auch große Gele mit Platz für bis zu 40 oder 60 Proben (28 cm x 34 cm) verwendet. Die elektrophoretische Trennung der Proteine erfolgte mit den kleinen Gelen bei einer Stromstärke von 30-40 mA und 300 V in 2 Stunden, mit den großen Gelen bei 40 bis 60 mA und 350 V in 12 bis 16 Stunden. Als Größenstandards dienten die Proteinmarker Dual Color (BioRad) und Benchmark (Invitrogen). Die zu analysierenden Proben wurden vor dem Auftragen in die Probentaschen mit 4x SDS Probenpuffer versetzt. Die Zusammensetzung eines Gels ist im nachfolgenden Schema aufgeführt. Für die kleinen Gele wurden nur etwa 10 % der aufgeführten Mengen benötigt.

TEMED und APS wurden der Gellösung erst kurz vor dem Gießen der Gele zugesetzt. Nach dem Gießen des Trenngels wurde dieses mit Ethanol überschichtet, um eine gerade Ausbildung der Oberfläche des Gels zu gewährleisten und das Gel vor dem Austrocknen zu schützen. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Ethanol entfernt und das Sammelgel gegossen, in welches dann ein Probenkamm eingefügt wurde.

	Sammelgel	Trenngel (10 %)	Trenngel (12 %)
Acrylamidstammlösung	5 ml	26,7 ml	32 ml
Sammelgelpuffer	6 ml	-	-
Trenngelpuffer	-	32 ml	32 ml
Wasser	18,8 ml	21 ml	15,7 ml
TEMED	0,03 ml	0,04 ml	0,04 ml
10 % (w/v) APS	0,2 ml	0,25 ml	0,25 ml
Sammelgelpuffer (5x):		0,5 % (w/v) SDS	
0,5 M TRIS-HCl pH 6,8		<u>Probenpuffer (4x):</u>	
0,4 % (w/v) SDS		0,1 M TRIS	
<u>Trenngelpuffer (2,5x):</u>		0,1 M Borsäure	
1,5 M TRIS-HCl pH 8,8		16 % (w/v) Saccharose	
0,4 % (w/v) SDS		0,16 % (w/v) Bromphenolblau	
<u>Elektrophoresepuffer (10x):</u>		6 % (w/v) SDS	
0,25 M TRIS		0,005 M MgCl ₂	
1,92 M Glycin		0,05 M DTT	

II.3.3 Silberfärbung

Die Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick [64] ist eine sehr empfindliche Methode, um Proteine nachzuweisen. Das SDS-Gel wurde aus der Gelapparatur entfernt und 20 Minuten in Fixierlösung inkubiert. Anschließend wird es dann 20 Minuten in Inkubationslösung geschwenkt. Nach diesem Schritt musste das Gel dreimal für je 10 bis 15 Minuten gründlich gewässert werden (bidest). Das Gel wurde dann 20 bis 30 Minuten in der Färbelösung inkubiert. Danach wurde die Färbelösung entfernt und das Gel kurz mit Wasser gewaschen. Anschließend folgte die Entwicklung des Gels innerhalb weniger Minuten, indem man es mit Entwicklerlösung behandelte und die Reaktion durch Zugabe von Stopplösung beendete. Das entwickelte Gel wurde mindestens 10 Minuten in der Stopplösung geschwenkt und dann in Folie eingeschweißt.

<u>Fixierlösung:</u>	Färbelösung:	
30 % (v/v) Ethanol (technisch)	0,1 % (w/v) Silbernitrat	
10 % (v/v) Essigsäure (technisch)	0,14 % (v/v) Formaldehyd	
Inkubationslösung:	Entwicklerlösung:	
30 % (v/v) Ethanol (technisch)	2,5 % (w/v) Natriumcarbonat	
0,5 % (w/v) Natriumacetat	0,14 % (v/v) Formaldehyd	
0,2 % (w/v) Natriumthiosulfat	Stopplösung:	
	2,3 M Zitronensäure	

II.3.4 Western Blot Analyse

II.3.4.1 Elektrotransfer auf eine Nitrocellulose-Membran

Zunächst wurden auf einer 12 %igen SDS-PAGE aufgetrennte Proteinproben in einer Western Blot Apparatur (LKB multiphor II, Amershan Pharmacia) mit zwei Blotting-Graphitelektroden (Nova Blot, Amersham Pharmacia) auf eine Nitrocellulosemembran (Protran BA83 Porengröße 0,2 µm, Schleicher & Schuell) oder eine PVDF Membranen (Millipore, Amsterdam) übertragen. Letztere musste vor Gebrauch kurz in Ethanol getränkt werden. Die Übertragungen wurden nach dem *Semi dry transfer protocol* durchgeführt. Der zu transferierende Bereich des SDS-Polyacrylamidgeles wurde zurecht geschnitten und luftblasenfrei auf der Transfermembran platziert. Oberhalb und unterhalb dieser beiden Schichten mussten ebenfalls luftblasenfrei jeweils drei auf Größe des Geles geschnittene *gelblotting* Papierbögen (GB002, Schleicher & Schuell) liegen. Das Gel, die Membran und die sechs *blotting* Papierbögen wurden zuvor in Transfer Puffer gewaschen, bzw. getränkt. Der Aufbau erfolgte so, dass die Transfermembran der Anode näher und das Gel der Kathode näher lag. Der Blot wurde über 90 bis 120 Minuten mit einem Strom von 0,8 mA/cm²
Gelfläche durchgeführt. Die transferierten Proteine wurden anschließend durch eine Inkubation der Membran von 5 Minuten in Ponceau-Rot Lösung gefärbt. Eine kurze Waschung in Wasser machte sie sichtbar und die Proteinbanden wurden markiert. Weitere Waschung entfärbte die Membran.

<u>Transfer Puffer:</u>	Ponceau-Rot:
25 mM TRIS pH 8,3	0,5 % Ponceau S
150 mM Glycin	1 % Essigsäure (techn.)
10 % (v/v) Methanol (techn.)	

II.3.4.2 Immundetektion der membrangebundenen Proteine

Trockene PVDF Membranen mussten zunächst kurz in Ethanol getränkt werden. Die Membran wurde dann 10 Minuten in TBS Puffer geschwenkt und 1 Stunde in Caseinlösung inkubiert, um noch offene Bindestellen der Nitrocellulosemembran zu sättigen. Dem folgten zwei 10 minütige Waschschritte in TBT und ein 10 minütiger Waschschritt in TBS Puffer. Die Inkubation der Nitrocellulose- oder PVDF Membran mit dem in Caseinlösung verdünnten Primärantikörper, erfolgte je nach eingesetztem Antikörper unterschiedlich. Der Anti-ETR1 Antikörper HRR wurde 1 : 5000 aus der Stammkonzentration verdünnt eingesetzt. Der Anti-DnaK Antikörper wurde 1 : 500, der Anti-TetraHis 1 : 1000 verdünnt eingesetzt. Die Inkubation von Transfermembranen mit den ersten beiden Primärantikörpern wurde für 1 Stunde bei 22°C, die Inkubation mit Anti-TetraHis Antikörpern über Nacht bei 6°C durchgeführt.

TBS: 10 mM TRIS/HCl pH 7,5	<u>TBT:</u> 20 mM TRIS/HCl pH 7,5
150 mM NaCl	500 mM NaCl
Caseinlösung: 1 % (w/v) Casein in 1x Tl	BS 0,5 % (v/v) Tween 20

Anschließend wurde die Membran wieder zweimal 10 Minuten in TBT und einmal 10 Minuten in TBS Puffer geschwenkt. Der jeweilige Sekundärantikörper (Anti ETR1: Anti-Rabbit, Anti-DnaK und Anti-TetraHis: Anti-Mouse) wurde 1 : 10.000 in Caseinlösung verdünnt und 1 Stunde bei 22°C mit der Membran inkubiert. Dann wurde dreimal 10 Minuten mit TBT und zweimal 5 Minuten mit TBS Puffer gewaschen. An den Sekundärantikörper ist eine Peroxidase gekoppelt. Mit Immobilon Western Chemilumineszenz HRP Substrat der Firma Millipore konnte dieses Enzym eine Reaktion katalysieren, in deren Verlauf Licht emittiert wurde. Die Lumineszenzreaktion wurde mit wenigen Millilitern Lumineszenzreagenz, der dünn auf die Membran aufgetragen wurde, gestartet und ließ an den Stellen, an denen das gesuchte Protein lokalisiert war, dieses sichtbar werden. Die Lichtreaktion wurde im Lumineszenzdetektor LAS 1000 (Fuji Film) detektiert und digital gespeichert.

II.3.4.3 Quantifizierung der Lumineszenzsignale

Der Anteil an ETR1 Protein in der nach II.5.3 nativ gereinigten Protein Präparation wurde mittels Quantifizierung des Lumineszenzsignals mit der Fuji Film Software Image Gauge 3.0 durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Proteinmengen einer Probe dieser Präparation und einer Probe an hochreinem ETR1₁₆₅₋₇₃₈ (II.5.5) mit HRR Antikörpern detektiert, das Signal quantifiziert und dann bezogen auf ein µg Protein umgerechnet. Das Verhältnis der ermittelten Signal/µg Protein Werte ergab den Anteil an ETR1 Protein in der nach II.5.3 gereinigten Präparation.

II.3.5 Dimerisierungsexperimente

Disulfidbrücken sind Teil der posttranslationalen Stabilisierungsstrategie von Proteinstrukturen. Zwei entfernte Cysteine eines Proteins kommen durch die Proteinfaltung einander so nahe, dass eine Bindung ausgebildet werden kann, die die Proteinstruktur stabilisiert. Das Messprinzip der hier *in vitro* durchgeführten Dimerisierung beruht darauf, dass auch mit Hilfe von schwachen Oxidationsmitteln zwei nahe beieinander befindliche Cysteine in einer Redoxreaktion miteinander reagieren und eine Disulfidbrücke bilden. Die Experimente zur Dimerisierung des Ethylenrezeptors wurden mit dem nach II.5.1 gereinigten ETR1 und ETR1_{C4SC65} Protein durchgeführt. Die Messansätze hatten ein Volumen von 50 bis 2000 µl. Das Protein wurde mit Puffer O auf eine Konzentration von 0,4 mg/ml verdünnt. Die Bildung der Disulfidbrücken wurde durch die Zugabe von CuCl₂ in einer Endkonzentration von 1 mM gestartet und die Probe anschließend bei Raumtemperatur

Puffer O:

20 mM TRIS-HCl pH 8,5 0,03% (w/v) β-Dodecylmaltosid 45 Minuten inkubiert. Danach wurden die Proben kurz zentrifugiert, um eventuell präzipitiertes Protein zu entfernen. Der Überstand wurde abgenommen. Ein Aliquot jeder Messung wurde außerdem als Kontrolle mit DTT versetzt. Die Proben wurden dann mit 4x SDS Probenpuffer versetzt und in einer SDS PAGE analysiert (II.3.2).

II.3.6 Bestimmung des isoelektrischen Punktes

Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes von Proteinen wurde mit dem Criterion IEF Gel System der Firma BioRad nach Anleitung des Handbuches in 2,5 Stunden durchgeführt. In der Gelelektrophorese wurden etwa 10 bis 20 µg Protein eingesetzt. Zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes (pI) wurde auch ein Aliquot des IEF Standards (BioRad) aufgetrennt. Die Gele wurden anschließend nach II.3.3 gefärbt. Der theoretische pI wurde auf der Basis der Aminosäuresequenz mit dem Programm "compute pI / MW" (http://www.expasy.org) bestimmt.

II.3.7 Massenspektrometrische Analyse

Die Methode der Massenspektrometrie beruht auf der Ionisierung von Peptidfragmenten die aus dem zu analysierenden Protein durch Behandlung mit verschiedenen Proteasen wie z.B. Trypsin gebildet werden. Der Verdau mit Trypsin, welches nur auf der C-terminalen Seite der basischen Aminosäuren Lysin und Arginin spaltet, gibt definierte, kleine Peptidfragmente, deren Aminosäureabfolge nach der Ionisierung durch die Bestimmung der Masse der ionisierten Fragmente bestimmt werden kann. Die massenspektrometrische Analyse einer nach II.5.3 gereinigten ETR1 Probe wurde im Biologisch Medizinischem Forschungszentrum (BMFZ) der Universität Düsseldorf durchgeführt. Das Ergebnis der Analyse ist im Anhang aufgeführt.

II.3.8 Experimente zur Histidinkinaseaktivität

II.3.8.1 minimaler Messansatz

Das hier angewandte Messprinzip beruht auf der radioaktiven Markierung des γ -Phosphates eines ATP Moleküls. In der Phosphorylierungsreaktion, die eine Histidinkinase typischerweise katalysiert, wird dieser endständige Phosphatrest eines ATP auf ein Histidin übertragen. Handelt es sich bei diesem γ -Phosphat um

ein radioaktives ³²PO₄- Molekül, so ist damit das Protein, dessen Histidinrest phosphoryliert wird, radioaktiv markiert. Trennt man die Probe in einer SDS-PAGE auf, so wird die markierte Proteinbande in einer Radiographie sichtbar.

Puffer K:	50 mM TRIS/HCl pH 7,5	
	50 mM KCl	
	10 mM MnCl ₂	
	0,05 % (w/v) Dodecylmaltosid	

Die Entwicklung des hier durchgeführten Messansatzes zur Analyse der Autokinaseaktivität ist an die Untersuchungen von Gamble et al. und Zhang et al. [44,,47] an dem löslichen Teil von Ethylenrezeptorproteinen angelehnt. Eingesetzt in den Messungen wurde nach II.5.3 bis II.5.5 gereinigtes Protein. Sie wurden bei einer Proteinkonzentration von 0,5 bis 1 mg/ml in einem Volumen von 50 µl Puffer K durchgeführt. In manchen Messungen wurde der Cofaktor MnCl₂ durch CaCl₂ oder MgCl₂ ersetzt. Gestartet wurde die Reaktion durch die Zugabe von 200 µM ATP, welches zuvor mit γ^{32} P-ATP versetzt worden war, so dass im Messansatz eine Radioaktivität von 0,5 Ci/mmol ATP vorlag. Nach 30 bis 45 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 4x SDS Probenpuffer gestoppt und die Proben bei -20°C gelagert.

II.3.8.2 Messung des Ethylenagonisten Cyanid und -antagonisten 1-MCP

Grundlage hierfür waren die unter II.3.8.1 beschriebenen Messungen in Gegenwart von MnCl₂. Zusätzlich wurde 0,1 mM des für die Ethylenwahrnehmung wichtige Kofaktors CuCl₂ eingesetzt. In den Messungen in Gegenwart von MCP oder KCN wurden der Ethylenagonist bzw. -antagonist zwei Minuten vor dem Start der Reaktion zugegeben. MCP wurde in Konzentration von 50 bis 1000 µM eingesetzt, KCN in Konzentration von 2,5 bis 200 µM. In Kontrollen wurden entweder CuCl₂, KCN, MCP oder keines eingesetzt. Bei Messungen in Gegenwart beider Substanzen wurde diejenige, die mit dem ETR1 Protein zuerst inkubiert werden sollte, 12 Minuten vor der Messung zugegeben und die zweite in einem sehr geringen Volumen zwei Minuten vor der Messung zugesetzt.

II.3.8.3 Analyse der Histidinkinasemessungen

Radioaktiv markierte Proteinbanden wurden mit dem Speicherfoliensystem BAS von Fuji Film sichtbar gemacht [65,66]. Dazu wurden Aliquots aller gemessenen Proben in einer SDS PAGE (II.3.2) in kleinen Gelen aufgetrennt. Die Gele wurden anschließend auf eine NC oder PVDF Membran transferiert (II.3.4.1). Die Molekulargewichte der in der Radiographie detektierten Proteinbanden wurden mit Hilfe des in der PAGE eingesetzten und auf die Membran übertragenen *Dual Color* Marker zugeordnet. Die Membran wurde für 24 bis 72 Stunden mit einer Phosphor Imaging Plate (Fuji Film) belegt, um die radioaktiven Signale sichtbar zu machen. Anschließend wurde diese mit dem FLA 3000 (Fuji Film) ausgelesen und digital gespeichert. Als Kontrolle der übertragenen Proteinmengen diente die Ponceaufärbung der Transfermembran.

II.3.8.4 Behandlung mit Säure oder Base

Hierzu wurden PVDF Membranen mit wie unter II.3.8.3 aufgetrennten und transferierten Proben vor der Belegung für 3 Stunden entweder in 3 M NaOH oder 1 M HCl geschwenkt. Kontrollmembranen wurden in Wasser geschwenkt.

II.3.8.5 Quantifizierung

Quantifizierung von radioaktiven Messungen wurden mit der Fuji Film Software Image Gauge 3.0 an den digitalen Daten der FLA 3000 Messung vorgenommen.

II. 4 Zirkular Dichroismus- (CD-) Spektroskopie

II.4.1 Messprinzip und Datenverarbeitung [67-69]

Das Messprinzip der CD-Spektroskopie beruht darauf, dass asymmetrische Moleküle unterschiedliche Extinktionskoeffizienten für links- (ϵ_L) und rechts- (ϵ_R) zirkular polarisiertes Licht aufweisen. Links- und rechtszirkular polarisiertes Licht wird von diesen Molekülen also unterschiedlich stark absorbiert. Die CD-Spektroskopie misst den Unterschied zwischen diesen beiden Koeffizienten. Diese Differenz wird meistens in Form der Elliptizität (Θ) angegeben, die über die folgende Formel verknüpft sind.

$$\Theta = \ln 10 \cdot \frac{180}{2\pi} \cdot (\varepsilon_L - \varepsilon_R) \cdot c \cdot d \quad (\text{mit c: Konzentration und d: Schichtdicke})$$

Zu einem CD-Effekt kommt es nur bei optisch aktiven Molekülen, d.h. bei Molekülen, deren elektrisches und magnetisches Übergangsdipolmoment nicht genau senkrecht aufeinander stehen. Verschiedene Sekundärstrukturelemente von Proteinen weisen in dieser Hinsicht unterschiedliche asymmetrische Eigenschaften auf und lassen sich somit im CD-Spektrum zuordnen. Informationen über die Sekundärstruktur liefern dabei die Elektronenübergänge der Amidgruppen im Proteinrückgrat im fernen UV-Bereich (~170-260 nm), wohingegen die Elektronenübergänge der aromatischen Seitenketten (~260-290 nm) Aufschluss über die Tertiärstruktur des Proteins geben.

Anhand eines CD-Spektrums lassen sich die Anteile der einzelnen Sekundärstrukturelemente ermitteln. Vorhandene α -Helices und β -Faltblätter tragen anhand ihres prozentualen Sequenzanteils am Gesamtprotein zu einem Spektrum in gleichem Maße bei. Bezüglich der Auswertung gibt es verschiedene Lösungsansätze. Bereits der Vergleich des Spektrums mit den Spektren von Modellpeptiden (Abbildung 2-1), die reine α -Helices oder β -Faltblätter bilden, gibt einen Aufschluss über die dominierenden Sekundärstrukturen. Computerprogramme kombinieren meist verschiedene Algorithmen mit dem Vergleich von Spektren bereits bekannter Strukturen. Darüber hinaus gibt es Programme, deren Ansatz auf der *neuronal network* Strategie basiert [70-72].

Die Messung der CD-Spektren erfolgte mit einem Spektralpolarimeter J715 (Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt) bei Raumtemperatur in 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4. Bei Proben des ETR1 und ETR1₁₋₆₀₉ Protein wurde noch zusätzlich 0,03 % (w/v) Dodecylmaltosid zugegeben. Es wurden Mikroküvetten mit einer Schichtdicke von 1 mm (Helma, Mülheim) verwendet. Typischerweise wurden Proteinkonzentrationen von 0,1 bis 0,3 mg/ml eingesetzt. Mit einer Geschwindigkeit von 50 nm/min wurde bei einer Bandbreite von 2 nm zwischen 185 und 260 nm je Nanometer Wellenlänge ein Datenpunkt gemessen. Für jedes gemessene Spektrum wurden 10 bis 15 Messungen akkumuliert, gemittelt und gegen das entsprechende Pufferspektrum korrigiert. Anhand der ermittelten Proteinkonzentration der Messprobe erfolgte die Umrechnung der gemessenen Elliptizität in *mean residue weight* Elliptizität (Θ_{MRW}), wo der Wert auf die mittlere Molmasse einer Aminosäure des Proteins (MRW) gemittelt ist:

$$\Theta_{MRW} = \Theta \cdot 100 \cdot \frac{MRW}{c \cdot d}$$

Abbildung 2-1:



II.4.2 Computerauswertung der CD Daten

Quantitative Sekundärstrukturanalysen wurden mit dem Computerprogramm k2d, das auf dem *neuronal network* Ansatz basiert [71,72], durchgeführt. Es ist für eine hohe Genauigkeit bei der Berechnung des α-helicalen Anteils bekannt.

II.5 Proteinpräparation

Die Proteinexpression wurde mit einem T7-Polymerase Expressionssystem durchgeführt. Die zu exprimierenden Gene waren hinter einen T7 Polymerase Promotor eines pET Vektors der Firma Novagen kloniert worden. Die verwendeten Bakterienstämme trugen eine chromosomale Kopie eines durch ein *lac* Operon kontrolliertes T7 Polymerase Gens. Mit Zugabe des Laktoseanalogon IPTG konnte die Expression der Polymerase und damit auch der Zielgene induziert werden. Die im Folgenden für die nicht modifizierten Proteine beschriebenen Expressions- und Reinigungsvorschriften wurden genauso für die Expression und Reinigung der modifizierten ETR1_{C4SC65}, ETR1_{H353A} und ETR1_{165-738 H353A} Proteine verwendet.

II.5.1 Expression der Proteine ETR1, ETR1₁₋₆₀₉ und ETR1₁₆₅₋₇₃₈

II.5.1.1 Expression der Proteine ETR1 und ETR1₁₋₆₀₉

C43 (DE3) Zellen wurden mit 400 ng pETR1 bzw. p ETR1₁₋₆₀₉ Vektor nach II.2.2.2.2 transformiert. Mit einer transformierten Kolonie wurde eine 500 ml Vorkultur (2YT-Amp) in einem Erlenmeyerkolben ohne Schikanen angeimpft und über Nacht bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Mit 40 ml dieser Vorkultur wurden 500 ml Haupt-kulturen (2YT-Amp Medium) in Erlenmeyerkolben mit Schikanen angeimpft. Die Kulturen wuchsen im Schüttelinkubator bei einer Rotationsfrequenz von etwa 200 upm bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0-1,2. Die Expression wurde dann mit IPTG in der Endkonzentration von 0,5 mM induziert. 6 bis 7 Stunden nach Induktionsbeginn wurden die Zellen bei 4000 g in 10 Minuten pelletiert. Die Bakterienpellets konnten in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –20°C gelagert werden.

II.5.1.2 Expression des ETR1₁₆₈₋₇₃₈ Proteins

BL 21 (DE3), die das Plasmid pRARE enthielten, wurden mit 400 ng pETR1₁₆₈₋₇₃₈ Vektor nach II.2.2.2 transformiert. Mit jeweils einer transformierten Kolonie wurde eine 100 ml Vorkultur (2YT-Amp+Cam) in einem Kolben ohne Schikanen angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Mit 50 ml der Vorkultur wurden 800 ml Hauptkulturen (2YT-Amp) in Kolben mit Schikanen angeimpft. Die Kulturen wuchsen im Schüttelinkubator bei einer Rotationsfrequenz von etwa 200 upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 und die Expression des ETR1₁₆₅₋₇₃₈ Proteins wurde dann mit IPTG in einer Endkonzentration von 0,5 mM induziert. Vier Stunden nach Induktionsbeginn wurden die Zellen bei 4000 g in 10 Minuten pelletiert. Die Pellets wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –20°C gelagert.

II.5.2 Aufschluss und Solubilisation der Proteine ETR1 und ETR1₁₋₆₀₉

10 g Bakterienpellets der Expression von ETR1 oder ETR1₁₋₆₀₉ wurden in 30 ml kaltem Puffer H resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden mit einer gekühlten 40K French Press Aufschlusszelle zweimal bei einem Druck von 1200 psi durch das Ventil der Zelle gepresst. Danach wurde das erhaltene Zelllysat bei 40.000 g für 30 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen und nochmals in der Ultrazentrifuge bei 100.000 g für 1,5 h zentrifugiert. Nach diesem Schritt wurde bei Raumtemperatur weiter gearbeitet. Um das Protein aus den Membranen herauszulösen, wurden die Pellets der beiden Zentrifugationsschritte im Falle der nativen Reinigung in 15 ml Puffer H versetzt mit 1,2% Natriumcholat (w/v) oder im Falle der denaturierenden Reinigung in Harnstoff enthaltendem Puffer G resuspendiert. Nach einer Inkubation von 1 Stunde bei 37°C wurde das unlösliche, nicht solubilisierte Material durch Zentrifugation bei 40.000 g in 20 Minuten entfernt.

Puffer H: 50 mM TRIS/HCl pH 7,5	Puffer G: 20 mM TRIS/HCl pH 8
15 % (w/v) Glycerin	100 mM NaCl
200 mM NaCl	8 M Harnstoff
0,002 % (w/v) PMSF	

II.5.3 Native Reinigung des ETR1 Proteins

II.5.3.1 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Der geklärte Überstand der Solubilisation wurde für den Reinigungsschritt der hydrophoben Interaktionschromatographie mit dem etwa 0,8 bis 0,9 fachen Volumen an Puffer H verdünnt, um die Natriumcholatkonzentration zu verringern. Anschließend wurde die Lösung auf eine Ammoniumsulfatkonzentration von 1,6 M gebracht und durch Zentrifugation geklärt.

Die HIC wurde nach der nachfolgend beschriebenen Methode automatisiert an der BioCAD 750 E betrieben. Eine mit POROS ET 20 Material (Perseptive Biosystems) gefüllte Säule (4,6 mm Durchmesser, 100 mm Höhe) wurde bei einer Flussrate von 10 ml/min betrieben. Die Säule wurde mit 25 mM Tris-HCl pH 7,5, 1,6 M Ammoniumsulfat und 0,2% (w/v) Natriumcholat equilibiert. Ein Aliquot des mit Ammoniumsulfat versetzten und durch einen 0,2 μ m Filter (Schleicher und Schuell) filtrierten Überstands der Solubilisation wurde auf die Säule geladen und über einen linearen Ammoniumsulfatgradienten von 1,6 M auf 0 M eluiert. Die Proteinkonzentration von Elutionsfraktionen wurde photometrisch bei 280 nm gemessen und aufgezeichnet. Fraktionen, die dem mit ETR1 Protein assoziierten UV Absorptionspeak zugeordnet waren, wurden vereint und mit Puffer Z 1 : 2 verdünnt, um die kritische Salzkonzentration zu verringern. Diese Chromatographie wurde automatisiert wiederholt, bis das komplette Solubilisat eingesetzt worden war. Die vereinten Elutionsfraktionen wurden mit Amicon Ultra-15 Ultrafiltratoren auf ein Volumen von etwa 500 μ l konzentriert und einmal mit Puffer Z gewaschen. Dazu wurde das Proteinkonzentrat 1 : 20 in Puffer Z verdünnt und nochmals konzentriert.

II.5.3.2 Präparative Gelfiltration

Verwendet wurde eine Gelfiltrationssäule (1m x 1 cm²), die mit Sephacryl S200 Material (Pharmacia) befüllt war. Die Säule wurde bei einer Flussrate von 1,5 ml/min betrieben und mit Puffer Z equilibriert. Das auf ein Volumen von 500 μ l konzentrierte Protein der HIC Reinigung wurde auf diese Säule aufgetragen. Nach 30 Minuten wurden 750 μ l Fraktionen des eluierenden Proteins gesammelt und in einer SDS-PAGE analysiert. Fraktionen der höchsten Reinheit wurden vereint, konzentriert und bei 4°C oder -70°C gelagert.

II.5.4 Reinigung unter denaturierenden Bedingungen der Proteine ETR1 und ETR1₁₋₆₀₉

II.5.4.1 Immobilisierte Metallchelat Affinitätschromatographie (IMAC)

Das mit 8 M Harnstoff aus den Membranen extrahierte Protein wurde in einer Polypropylensäule (1 x 1 x 20 cm³), deren Ausfluss mit einem Hahn regulierbar war, auf mit Puffer G equilibrierte NiNTA-Agarose geladen. Das Säulenmaterial wurde aufgewirbelt und mit der Proteinlösung für 20 Minuten auf einem Taumelschüttler inkubiert. Nachdem die Proteinlösung abgelassen worden war, wurde die NiNTA-Agarose zunächst mit 10 Säulenvolumen Puffer G und dann mit 30 Volumen Puffer G, der mit 35 mM Imidazol versetzt war, gewaschen. Gebundenes Protein wurde dann in 5 Säulenvolumen mit 250 mM Imidazol in Puffer G eluiert. Um eventuelle kleinere Aggregate zu entfernen, wurde das Eluat 30 Minuten bei 100.000 g in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde einmal im Ultrafiltrator mit Puffer G gewaschen, um die Imidazolkonzentration zu verringern und auf eine Konzentration von etwa 0,5 bis 0,7 mg Protein / ml eingestellt.

II.5.4.2 Renaturierung

Die Proteinrenaturierung wurde durch Verdünnen der gereinigten und konzentrierten Probe mit Puffer R im Verhältnis von etwa 1 : 20 durchgeführt. Das Protein wurde dann im Ultrafiltrator einmal mit Puffer R gewaschen und auf eine Proteinkonzentration von 1 bis 2 mg/ml eingestellt. Bis zu 2 ml des so renaturierten Proteins konnten in einem Schritt einem Pufferwechsel über eine PD10-Entsalzungsäule unterzogen werden. Diese war zuvor mit 25 ml Puffer KO equilibriert worden. Nach Auftragung der Proteinprobe wurde das Protein mit bis zu 5 ml Puffer KO in 500 µl Fraktionen eluiert. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden über eine Proteinbestimmung ermittelt und konnten bei 4°C gelagert werden.

Puffer R: 50 mM TRIS-HCl pH 8,2	Puffer KO: 50 mM TRIS-HCl pH 7,5
250 mM NaCl	100 mM KCl
1 mM KCl	0,1 % (w/v) β -Dodecylmaltosid
100 mM DTT	
0,0003 % (v/v) PEG 3350	
0,1 % (w/v) β-Dodecylmal	tosid

II.5.5 Reinigung unter denaturierenden Bedingungen des ETR1₁₆₅₋₇₃₈ Proteins

II.5.5.1 Aufschluss und IMAC

In 30 ml 4°C kaltem Puffer L6 werden 3 g BL21 (DE3) Zellen resuspendiert. Mit einer gekühlten 40K French Press Aufschlusszelle wurden die Zellsuspension zweimal bei einem Druck von 1200 psi aufgeschlossen. Zelltrümmer und unlösliche Bestandteile wurde durch Zentrifugation bei 40.000 g in 20 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das Volumen bestimmt und die Lösung mit gleichem Volumen an Puffer L9 verdünnt. Die resultierende Lösung wurde in einer Polypropylensäule (1 x 1 x 20 cm³), deren Ausfluss mit einem Hahn regulierbar war, auf mit Puffer L75 equilibrierte Ni-NTA-Agarose geladen. Das Säulenmaterial wurde

aufgewirbelt und mit der Proteinlösung für 20 Minuten auf einem Taumelschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Proteinlösung abgelassen, die Ni-NTA Agarose mit 8 Volumen Puffer L75 (30 mM Imidazol) gewaschen und schließlich in 3 Volumen mit 200 mM Imidazol in Puffer L75 eluiert. Um eventuelle kleinere Aggregate zu entfernen, wurde das Eluat 30 Minuten bei 100.000 g in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in Ultrafiltratoren auf 2,5 ml eingeengt.

Puffer L6: 100 mM BISTRIS-HCl pH 6	Puffer M: 50 mM Tris-HCl pH 8,2	
8 M Harnstoff	2 mM CaCl ₂	
150 mM NaCl	2 mM MgCl ₂	
20 mM β-Mercaptoethanol	10 mM NaCl	
0,002% PMSF	1 mM KCl	
Puffer L75: 100 mM TRIS-HCl pH 7,5	0,002 % PMSF	
8 M Harnstoff	0,03 % (w/v) β -Dodecylmaltosid	
150 mM NaCl	Puffer L9: 100 mM TRIS-HCl pH 9	
0,002% PMSF	8 M Harnstoff	
	150 mM NaCl	

II.5.5.2 NEM Modifikation und Renaturierung

Da es zunächst bei der Renaturierung des ETR1₁₆₅₋₇₃₈ Proteins zur Präzipitation des Proteins kam, wurden die Sulfhydrylgruppen der Cysteine mit N-Ethylmaleimid (NEM) alkyliert, damit diese beim Renaturierungsprozess keine unerwünschten Disulfidbrücken ausbilden konnten. Dazu wurde das auf 2,5 ml eingeengte Protein 15 Minuten mit 10 mM NEM inkubiert. Anschließend wurden überschüssiges NEM und Imidazol entfernt. Dazu wurde das Protein auf eine equilibrierte PD10 Säule geladen und in 3,5 ml Puffer L75 eluiert. Die Renaturierung wurde durch Verdünnen mit Puffer M durchgeführt. Um aggregiertes Protein abzutrennen, wurde die Lösung anschließend nochmals 30 Minuten bei 100.000 g in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Danach wurde der Überstand in Ultrafiltratoren auf ein Volumen von 500 bis 1000 μ l konzentriert. Das Konzentrat wurde noch zweimal im Ultrafiltrator 1 : 10 mit Puffer M gewaschen und schließlich auf ein Volumen von 250 μ l eingeengt.

III Ergebnisteil

III.1 Allgemeine Einführung

In dieser Arbeit sollte der Ethylenrezeptor ETR1 aus *Arabidopsis thaliana* funktionell und strukturell charakterisiert werden.

Es ist bekannt, dass das ETR1 Rezeptorprotein *in vivo* als Homodimer vorliegt, welches über zwei Disulfidbrücken untereinander verbunden ist. Mit heterolog exprimiertem und gereinigtem ETR1 Protein konnte *in vitro* unter oxidativen Bedingungen die Bildung eines kovalenten Dimers nachvollzogen werden.

Zur Bestimmung des Sekundärstrukturanteils wurden CD Spektren von dem gereinigten Rezeptorprotein sowie an verschiedenen Teilbereichen des ETR1 Proteins (ETR1₁₋₆₀₉, ETR1₁₆₅₋₇₃₈) gemessen. Diese Messungen ermöglichten Rückschlüsse auf die Sekundärstrukturanteile der einzelnen Domänen.

Die in der Literatur beschriebene Kinaseaktivität des ETR1 Protein wurde bisher nicht mit gereinigtem ETR1 Protein gezeigt, welches auch die Membrandomäne enthielt. Da dieser Messansatz in meiner Arbeit gelang, war es nun erstmalig möglich, die Regulation der Phosphorylierungsaktivität durch Ethylenagonisten und -antagonisten zu beobachten. Darüber hinaus wurden verschiedene Experimente zur Charakterisierung der Phosphorylierungsstelle durchgeführt.

Für all diese Experimente war es zunächst erforderlich, ETR1 Rezeptorprotein in ausreichender Menge und Reinheit zur Verfügung zu haben. Zu diesem Zweck wurden ausgehend von dem in meiner Diplomarbeit etablierten Präparationsprotokoll zwei verschiedene Reinigungsstrategien entwickelt.

III.1.1 Vorstellung der Proteinreinigungsstrategie

Bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit ist es gelungen, das Ethylenrezeptorprotein ETR1 heterolog in einem speziell für die Expression von Membranproteinen selektierten *E. coli* Stamm, C43 (DE3), zu exprimieren. Dieser Stamm bildet ein endogenes Membransystem aus, in das Membranproteine integriert werden können [58]. Aus diesen Membranen lässt sich das Protein mit Hilfe milder Detergenzien, die den hydrophoben Membranbereich des Proteins in hydrophiler, wässriger Lösung schützen, herauslösen.

Die in der Diplomarbeit zur Reinigung angewandte, immobilisierte Metallchelat-Affinitätschromatographie (IMAC) über einen N-terminalen Hexahistidinanker erwies sich unter nativen Bedingungen als problematisch. In analytischem Maßstab lässt sich mit dieser Methode zwar gereinigtes ETR1 Protein gewinnen, aber in präparativen Maßstäben konnten keine für strukturelle und funktionelle Untersuchungen benötigten Ausbeuten erzielt werden. Außerdem nahmen Verunreinigungen deutlich zu, die aufgrund einer schwachen Bindung des ETR1 Proteins an NiNTA-Agarose nicht durch harsche Waschschritte entfernt werden konnten. Die nicht sehr feste Bindung an NiNTA-Agarose lässt sich vermutlich durch die Nähe des Histidinankers zur Membrandomäne erklären. Nach dem Herauslösen des Proteins aus der Membran mit Detergenzien wird dieser Bereich von einer Art Detergenzgürtel umgeben [73]. Dadurch kann die sterische Zugänglichkeit des direkt der ersten Membranhelix vorgeschalteten Histidinankers beeinträchtigt werden. ETR1 Protein mit einem C-terminal fusionierten Histidinanker ließ sich jedoch nicht exprimieren. Aus diesen Gründen war es notwendig alternative Reinigungsmöglichkeiten zu entwickeln.

Proteinreinigung unter nativen und denaturierenden Bedingungen

Mit Hilfe einer hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC) konnte ETR1 Protein in hohen Ausbeuten unter nativen Bedingungen gereinigt werden. Allerdings zeigte sich im Rahmen der Untersuchungen des nach diesem Protokoll gereinigten Proteins eine Kontamination durch ein fremdes Protein, welches sich nicht chromatographisch abtrennen ließ. In funktionellen Untersuchungen sollte diese Kontamination die Charakterisierung des ETR1 Protein nicht unbedingt stören, für strukturelle Untersuchungen ist eine hochreine Proteinprobe aber eine notwendige Bedingung. Als weitere Möglichkeit der Reinigung bot sich eine IMAC unter denaturierenden Bedingungen an. Hiermit ließen sich hohe Ausbeuten erzielen. Das gereinigte ETR1 Protein war sehr sauber. Problematisch bei denaturierenden Reinigungen ist jedoch die Zerstörung der nativen Proteinfaltung durch chaotrope Reagenzien. Allerdings konnte das gereinigte ETR1 Protein in einem Renaturierungsschritt zurückgefaltet und danach sowohl in funktionellen als auch in strukturellen Untersuchungen erfolgreich eingesetzt werden.

III.2 Klonierungen und Proteinexpression

Alle Proteinexpressionen wurden mit einem T7-Polymerase Expressionssystem durchgeführt (II.2.12). Hierbei wurden Expressionsvektoren konstruiert, die 3' des T7 Promotors verschiedene Genbereiche des ETR1 Rezeptors, orientiert an dem modularen Aufbau des ETR1 Proteins trugen. Dieser modulare Aufbau umfasst im Wesentlichen vier Domänen. In der Membrandomäne liegen die Ethylenbindestelle und die beiden für die Bildung eines Homodimers verantwortlichen Cysteine. Die GAF-Domäne verbindet die sensorische Membrandomäne mit der Histidinkinasedomäne, in der alle für eine Phosphorylierungsaktivität notwendigen Sequenzmotive zu finden sind. C-terminal schließt sich der Antwortregulator an.

Abbildung 3-1:

modulare Zusammensetzung der ETR1 Proteine



Drei neue Expressionsvektoren wurden konstruiert. pETR1 enthielt die komplette ETR1 Gensequenz (Abb. 3-1B). pETR1₁₋₆₀₉ enthielt die Gensequenz für die ersten drei Domänen (Membrandomäne, GAF-Domäne und Kinasedomäne) (Abb. 3-1C) und pETR1₁₆₅₋₇₃₈ die Gensequenz der löslichen Domänen (GAF-Domäne, Kinasedomäne, Antwortregulator) (Abb. 3-1D). Das Plasmid pJV1, welches als Ausgangsvektor diente, beinhaltete 5' des vollständigen ETR1 Rezeptorgen gelegen die Codonsequenz für einen Hexahistidinanker, gefolgt von der DNA-Sequenz einer Thrombinerkennungssequenz (Abb. 3-1A). Die drei neu konstruierten Plasmide wiesen im Unterschied zu pJV1 vor dem N-Terminus des zu exprimierenden Proteins eine Dekahistidinanker Codonsequenz auf und statt der Thrombinerkennungssequenz eine Faktor-Xa-Erkennungssequenz. Thrombin und Faktor-Xa sind Proteasen, die eine Polypeptidkette nur innerhalb einer bestimmten Aminosäuresequenz spalten. Da die für die Proteinreinigung benötigte N-terminale Peptidsequenz strukturelle Untersuchungen stören kann, besteht so die Möglichkeit, diesen Bereich vom gereinigten Protein abzuspalten. Die Klonierung der Plasmide ist unter II.2.12 beschrieben.

Außerdem wurden verschiedene Substitutionsmutagenesen durchgeführt, die unter II.2.11 beschrieben sind. Für die Untersuchung der Dimerisierung wurden ein ETR1 Protein exprimiert, das anstelle der Cysteinreste in Position 4 und 6 Serinreste enthielt (ETR1_{C4SC6S}). Im Rahmen der Untersuchungen der Histidinkinaseaktivität wurde in den Proteinen ETR1 und ETR1₁₆₅₋₇₃₈ der Histidinrest 353 gegen Alanin substituiert.

Die Bedingungen der Expression für diese drei verschiedenen Gene und deren Mutanten sind unter II.5.1 beschrieben. Die Abbildung 3-2 zeigt die Western Blot Analysen von drei Zellaufschlüssen, durch die die erfolgreiche Expression sowohl des löslichen ETR1₁₆₅₋₇₃₈ Proteins als auch der die Membrandomäne beinhaltenden Proteine ETR1 und ETR1₁₋₆₀₉ belegt werden. Bakterienzellen, in denen das entsprechende Protein heterolog exprimiert worden war, konnten bis zum Aufschluss bei -70°C gelagert werden.

Abbildung 3-2:

Western Analyse der Expression der ETR1 Proteine



III.3 ETR1:Native Reinigung, erste Untersuchungen

III.3.1 Hydrophobe Interaktionschromatographie und Gelfiltration

Nach Aufschluss der Bakterienzellen wurde das ETR1 Rezeptorprotein zunächst mit dem Detergenz Natriumcholat aus den Bakterienmembranen herausgelöst (II.5.2). Die Reinigung des ETR1 Proteins erfolgte durch eine hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) (II.5.3.1). Es wurde jeweils ein Aliquot des geklärten Überstandes des Solubilisationsschrittes der ETR1 Reinigung auf eine equilibrierte POROS 20 ET Säule geladen. Die Analyse der eluierten Fraktionen in einer SDS-PAGE ist in Abbildung 3-3A dargestellt. Man erkennt auf dem silbergefärbten Gel in den Spuren 5 bis 15 eine Bande zwischen 70 und 80 kDa, die dem ETR1 Protein zugeordnet wurde. In diesen ETR1 enthaltenden Fraktionen sind geringe Verunreinigungen durch Proteine der Größen von etwa 50, 40 und 25 kDa zu erkennen. In den Spuren 7 bis 11 war außerdem knapp unterhalb von 160 kDa eine schwache Proteinbande zu erkennen, die in den mit DTT versetzten Proben fehlte. Dies deutete darauf hin, dass es sich bei diesem Protein um das über zwei Disulfidbrücken im Bereich des N-Terminus gebildete ETR1 Homodimer handelt. Das bei einer Absorption von 280 nm aufgezeichnete Chromatogramm der Elution (Abb. 3-3B) wies einen Peak auf, der sich über die Fraktionen, in denen in der SDS-PAGE ein etwa 75 bis 78 kDa großes Protein nachgewiesen wurde, verteilte. Dieser Peak wurde somit auf die Absorption des ETR1 Proteins zurückgeführt. Auf diesem Hintergrund wurde die Auswahl der zu sammelnden Fraktionen anhand der Absorption bei 280 nm getroffen und die entsprechenden Fraktionen aller Chromatographieläufe vereint und konzentriert.

Abbildung 3-3:

hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)



Mit der konzentrierten Proteinprobe wurde anschließend über eine Gelfiltrationschromatographie ein Austausch des Detergenz, nämlich Dodecylmaltosid gegen das bei der Solubilisation verwendete Natriumcholat, durchgeführt II.5.3.2. Das nicht ionische Detergenz Dodecylmaltosid trägt keine Ladung und kann in deutlich niedrigeren Konzentrationen eingesetzt werden. Deshalb ist es milder, und übt einen geringeren denaturierenden und destabilisierenden Effekt als Natriumcholat auf Proteine aus. Deshalb ist es für strukturelle und funktionelle Untersuchungen sehr viel besser geeignet. Mit Hilfe der Gelfiltration konnten darüber hinaus die Verunreinigungen kleineren Molekulargewichts abgetrennt werden. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 3-4 zusammengefasst. Dargestellt sind das Chromatogramm und das silbergefärbte Gel einer SDS-PAGE der gesammelten Fraktionen. Die Schulter im abfallenden Bereich des Hauptpeaks resultierte von den enthaltenen Verunreinigungen von etwa 40 und 50 kDa, die somit deutlich von den Hauptfraktionen des ETR1 Proteins abgetrennt wurden. Der kleine Peak bei etwa 60 ml Elutionsvolumen wurde auf eine Verunreinigung durch ein unbekanntes Proteinmultimer zurückgeführt. Das entsprechende Monomer war in den korrespondierenden Fraktionen auf dem SDS-Gel bei etwa 45 kDa erkennbar und eluierte vor den ETR1 Hauptfraktionen. Die Fraktionen an ETR1 Protein wurden vereinigt und konzentriert.

Abbildung 3-4:

Gelfiltration / Analyse des mit nativen Bedingungen gereinigten Proteins



Das Chromatogramm einer Gelfiltration der Proteinreinigungen unter nativen Bedingungen ist zusammen mit dem silbergefärbten SDS Gel der gesammelten Fraktionen in Abbildung 3-4A abgebildet. Abbildung 3-4B zeigt die Analyse der Reinheit des gesammelten und konzentrierten ETR1 Protein in einer SDS PAGE und in einer Western Blot Analyse mit ETR1 Antikörpern. Die Identität des Rezeptorproteins wurde mit ETR1 spezifischen Antikörpern bestätigt (Abb. 3-4B). Mit diesem Präparationsverfahren unter ausschließlich nativen Bedingungen konnten aus 10 g Bakterien 2 bis 3 mg Protein gewonnen werden und das gewonnene Protein zeigte in der SDS PAGE eine hohe Reinheit (Abb. 3-4B).

III.3.2 Dimerisierung in vitro

Nach den bisherigen Untersuchungen liegt das ETR1 Protein in Pflanzen als kovalent gebundenes Homodimer vor. Im Gegensatz dazu lag das heterolog exprimierte ETR1 Protein in der Hauptsache als Monomer vor. Ein geringer Anteil Homodimer konnte nach der beschriebenen Präparation beim gereinigten ETR1 nachgewiesen werden (Abb. 3-4B). Das durch zwei Disulfidbrücken ausgebildete Dimer ist in der SDS-PAGE bei einem Molekulargewicht von etwa 150 kDa sichtbar und kann durch die Zugabe von DTT reduziert und in die monomere Form umgewandelt werden.

Mit einer Reihe verschiedener Chemikalien, die in der Literatur im Zusammenhang mit der Oxidation von Disulfidbrücken beschrieben wurden [74,75], wurde versucht, die Dimerisierung des heterolog exprimierten Proteins *in vitro* zu initiieren. Mit Tetramethylazodicarboxamiden konnte kein Erfolg erzielt werden. Aber in Gegenwart von Kupfersalzen wurde die Bildung des Homodimers beobachtet. Um zu überprüfen, ob die in der Literatur beschriebenen Cysteinreste 4 und 6 für die hier beobachtete Dimerisierung verantwortlich sind, waren in einer ETR1 Mutante die betreffenden Cysteine gegen Serin substituiert worden (II.2.12). Sowohl mit nicht modifiziertem ETR1 Protein als auch mit ETR1_{C4SC65} Protein wurden die gleichen Experimente zur Oxidation der Monomere durchgeführt. Die Ergebnisse der wie in II.3.5 durchgeführten Experimente sind in Abbildung 3-5 dargestellt.

In Gegenwart von 1 mM CuCl₂ konnte ein großer Teil des monomeren ETR1 Proteins zu einem Dimer oxidiert werden (Spur 2). Um zu kontrollieren, ob es sich bei der Verknüpfung der Monomere um eine Disufildbrücke handelt, wurde anschließend DTT zugegeben. In der entsprechenden Spur 3 ist kein ETR1 Homodimer vorhanden. Die eingesetzte Proteinkonzentration hatte keinen Einfluss auf die Menge an oxidiertem, dimerisiertem ETR1. Eine Erhöhung der Konzentration des Oxidans CuCl₂ führte zur teilweisen Präzipitation des ETR1 Protein. In Spur 1 ist zwar zu

Abbildung 3-5:

in vitro Dimerisierungexperimente mit ETR1 und ETR1_{C4SC6S} Protein



erkennen, dass bereits nach der Proteinpräparation ein kleiner Teil des ETR1 als Homodimer vorliegt. Im Vergleich zu der Menge an Homodimer, die durch die Oxidation des ETR1 Monomers mit CuCl₂ entstanden ist (Spur 2), ist dieser Anteil allerdings sehr gering.

Das gereinigte ETR1_{C4SC6S} Protein hingegen liegt anschließend in monomerer Form vor (Spur 4). In Gegenwart von 1 mM CuCl₂ ist nur eine sehr geringe Bande an Protein, das auf der Höhe des ETR1 Homodimers läuft, zu erkennen (Spur 5). Dieses fehlt bei Zugabe von DTT (Spur 6). Im Vergleich zu der Menge an gebildetem Homodimer des ETR1 Wildtyproteins durch CuCl₂ in Spur 2 ist die bei der ETR1_{C4SC6S} Mutante in Spur 5 sichtbare Menge Dimer äußerst gering und lässt sich vermutlich auf die unspezifische Oxidation von anderen Cysteinen des Proteins zurückführen.

III.3.3 Massenspektrometrische Analyse

Im Folgenden werden die Ergebnisse einer massenspektrometrischen Analyse des ETR1 Proteins vorgestellt. Die Anwendung dieser Methode (II.3.7) hatte sich im Zusammenhang mit den Ergebnissen zur Untersuchung der Kinaseaktivität, die in Abschnitt III.6 vorgestellt werden, ergeben, da unklar blieb, welche Aminosäure im ETR1 Protein phosphoryliert wurde. Deshalb sollte *in vitro* phosphoryliertes Protein Abbildung 3-6: Western Blot Analyse des unter nativen Bedingungen gereinigten Protein mit



In Abbildung 3-6 ist die Western Blot Analyse mit DnaK Anti-körpern von nativ gereinigtem Protein, wie es in Abbildung 3-4B in einer Silberfärbung erkennbar ist, dargestellt. massenspektrometrisch analysiert werden, da mit dieser Methode eine eindeutige Identifizierung selbst verschiedener, phosphorylierter Aminosäuren innerhalb eines Proteins möglich ist.

Die zwei bisher durchgeführten Versuche einer massenspektrometrischen Analyse von unter nativen Bedingungen gereinigtem und in vitro phosphorylierten ETR1 Protein (II.3.7 und Anhang VI.4) ergaben überhaupt keine Identifikation von Fragmenten des ETR1 Rezeptorproteins. Es wurden jedoch Fragmente des DnaK Proteins aus E. coli nachgewiesen. Um zu überprüfen, ob dieses Protein tatsächlich in der gereinigten Proteinprobe vorliegt, wurde diese mit Antikörpern gegen DnaK in einer Western Blot Analyse untersucht. Der in Abbildung 3-6 dargestellte, immunologische Nachweis bestätigte das Ergebnis der Massenspektrometrie. Das Hitzeschockprotein DnaK, ein HSP70 Protein, hat in der SDS PAGE ein apparentes Molekulargewicht von etwa 75 bis 78 kDa. Die Proteinbande wurde also auf der gleichen Höhe wie das ETR1 Protein detektiert und ließ sich damit in SDS-PAGE nicht ETR1 der vom Protein

unterscheiden. Dass in den ersten beiden massenspektrometrischen Analysen kein ETR1 Rezeptorprotein nachgewiesen wurde, bedeutet nicht, dass dieses nicht in der Proteinprobe vorliegt. Mit ETR1 Antikörpern konnte dieses Protein zuvor eindeutig nachgewiesen werden und wie aus der Spur 6 der in Abbildung 3-9A gezeigten Western Blot Analyse hervorgeht, fand keine Kreuzreaktion dieses Antikörpers mit DnaK Protein statt. Der Anteil an ETR1 Rezeptorprotein in der Präparation wurde mit Hilfe der Quantifizierung der Signale von Western Blot Analysen bestimmt (II.3.4.3). So konnte abgeschätzt werden, dass ETR1 Protein etwa 30 bis 50 % des Gesamtproteins ausmacht. Zwar wurde versucht, durch Modifikationen des vorgestellten Reinigungsprotokolls (II.5.3/III.3.1) und mit weiteren chromatographischen Reinigungsschritten das DnaK Protein vom ETR1 Protein abzutrennen. Diese Versuche waren aber nicht erfolgreich. Deshalb mussten aufgrund der Verunreinigung durch DnaK strukturelle Untersuchungen des mit dieser Methode gereinigten Proteins ausgeschlossen werden. Für funktionelle Untersuchungen ist eine Verunreinigung nicht zwangsläufig störend, solange das DnaK Protein die Untersuchung nicht beeinflusst oder vom ETR1 Protein unterschieden werden kann.

III.4 ETR1, ETR1₁₋₆₀₉ ETR1₁₆₅₋₇₃₈: Reinigung unter denaturierenden Bedingungen und Renaturierung

Unter nativen Reinigungsbedingungen konnten also keine für strukturelle Untersuchungen ausreichenden und genügend reinen Proteinmengen des ETR1 Proteins bereitgestellt werden. Deswegen wurde ein Reinigungsprotokoll entwickelt, mit dem Protein unter denaturierenden Bedingungen über eine immobilisierte Metallchelat-Affinitätschromatographie (IMAC) gewonnen werden konnte. Mit Harnstoff extrahiertes Protein konnte über den Dekahistidinanker sehr gut an NiNTA-Agarose binden. Die beiden Proteine ETR1 und ETR1₁₋₆₀₉, die die Membrandomäne des Rezeptorproteins umfassten, konnten nach nahezu dem gleichen Protokoll mit nur geringen Änderungen präpariert werden, während das die löslichen Domänen umfassende ETR1₁₆₅₋₇₃₈ Protein, das in den exprimierenden Bakterienzellen als *inclusion bodies* anfiel, nach einem anderen Protokoll gereinigt wurde.

III.4.1 IMAC und Rückfaltung des ETR1₁₆₅₋₇₃₈ Protein

Das ETR1₁₆₅₋₇₃₈ Protein wurde mittels des Vektors pETR1₁₆₅₋₇₃₈ in Zellen des *E. coli* Stamms BL21 (DE3) heterolog exprimiert (II.5.1.2). Ein Großteil des Proteins fiel als unlösliche *inclusion bodies* an (Abb. 3-7, Spur 1 und 2). Daher wurden die Bakterienzellen, in denen ETR1₁₆₅₋₇₃₈ heterolog exprimiert worden war, in Gegenwart von 8 M Harnstoff aufgeschlossen. Das denaturierte Protein wurde mittels des IMAC Verfahrens gereinigt (II.5.5.1). Die Bindung an NiNTA-Agarose erfolgte über

Abbildung 3-7:

Reinigung von ETR1₁₆₄₋₇₃₈ Protein

- denaturierende IMAC und Renaturierung -



den N-terminal fusionierten Dekahistidinanker. ETR1₁₆₅₋₇₃₈ Protein konnte mit 200 mM Imidazol in großer Reinheit von der Säule eluiert werden (Spur 3).

Die Rückfaltung von gereinigtem, denaturiertem Protein wurde entsprechend der in II.5.5.2 beschriebenen Schritte durchgeführt. Da das ETR1₁₆₅₋₇₃₈ Protein in ersten Renaturierungsversuchen präzipitierte, wurde das Protein zunächst mit NEM behandelt (Spur 4). NEM reagiert mit den Thiolgruppen der Cysteine des Proteins und verhindert so die Ausbildung von Disulfidbrücken, die den Renaturierungsprozess stören können. Anschließend wurde das in einem Harnstoff Puffer vorliegende ETR1₁₆₅₋₇₃₈ Protein durch vorsichtiges Verdünnen renaturiert (Spur 5), und der restliche Harnstoff durch mehrfaches Waschen mittels Ultrafiltratoren entfernt. Das so renaturierte ETR1₁₆₅₋₇₃₈ Protein war von hoher Reinheit (Spur 6). Nach dieser Methodik konnten aus 10 g Zellen etwa 10 bis 15 mg gereinigtes ETR1₁₆₅₋₇₃₈ Protein gewonnen werden.

III.4.2 IMAC und Rückfaltung der Proteine ETR1 und ETR11-609

ETR1₁₋₆₀₉ wurde ebenfalls wie das ETR1 Protein im *E. coli* Stamm C43 (DE3) exprimiert (II.5.1). Die Extraktion der Proteine aus den Membranen der

Abbildung 3-8: Reinigung von ETR1 und ETR1₁₋₆₀₉ Protein - denaturierende IMAC und Renaturierung -



In Abbildung 3-8 ist die Reinigung von ETR1 Protein (3-8A) und ETR1₁₋₆₀₉ Protein (3-8B) dargestellt. Aliquots der Zwischenschritte wurden in einer SDS PAGE analysiert. In Spur 1 ist mit 250 mM Imidazol eluiertes Protein der IMAC aufgetragen, Spur 2 zeigt das Protein nach Konzentrierung und Waschung mit 8M Harnstoff im Ultrafiltrator. Ein Aliquot des Renaturierungsschrittes ist in Spur 3 zu erkennen. Die Spuren 4 bis 6 zeigen die Fraktionen der abschließenden Entsalzung und Umpufferung über eine PD10 Säule.

In der Spur M ist Dual Color Proteinstandard der Firma BioRad aufgetragen. Die als 75 kDa gekennzeichnete Bande entspricht dabei wie in Abb. 3-7 gezeigt 80 kDa.

aufgeschlossenen Bakterienzellen erfolgte mit 8 M Harnstoff (II.5.2). Mit Hilfe des Dekahistidinankers wurde das Rezeptorprotein anschließend in Gegenwart von 8 M Harnstoff an eine NiNTA-Agarose gebunden II.5.4.1. Die vereinigten Elutionsfraktionen einer solchen IMAC Präparation beider Proteine sind in Abbildung 3-8A und B dargestellt (Spur 1). Wie zu erkennen ist, konnte mit dieser Methode sehr sauberes Protein präpariert werden. Die Rückfaltung der Proteine in ihre native Struktur erfolgte wie unter II.5.4.2 beschrieben. Zunächst wurde durch Waschen mit Ultrafiltratoren die Imidazolkonzentration reduziert (Spur 2). Anschließend wurde die eigentliche Renaturierung durch das Verdünnung der Harnstoffkonzentration unter 500 mM in einem speziellen Puffer erreicht. Während der Optimierung dieses Schrittes waren mehrere Puffer verschiedener Salzkonzentrationen und unterschiedlichen pH-Wertes in Bezug auf ihre Rückfaltungseffizienz systematisch ausgetestet worden. Der daraus resultierende Renaturierungspuffer enthielt das Detergenz Dodecylmaltosid, um die Struktur der hydrophoben Membrandomäne in wässriger Lösung zu stabilisieren. Wird sie nicht durch Detergenzien geschützt, so kommt es zur Aggregation dieser Bereiche und das Protein präzipitiert. Mit der Gegenwart von DTT im Renaturierungspuffer wurde die Rückfaltung unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt um die Ausbildung von unspezifischen Disulfidbrücken während des Faltungsprozesses zu verhindern. Das verdünnte, renaturierte Protein wurde im Ultrafiltrator konzentriert (Spur 3) und mittels einer PD10 Entsalzungssäule in einen einfachen Puffer überführt (Spur 4 - 6). An reinem ETR1 Protein konnten mit dieser Präparationsvorschrift aus 10 g Bakterien etwa 3 mg Protein gewonnen werden. Für das ETR1₁₋₆₀₉ Protein ergab sich eine Proteinausbeute von etwa 2 mg reinem Protein.

III.4.3 Western Blot und Bestimmung des isoelektrischen Punktes

Aliquots aller denaturierend gereinigten Proteine, Wildtyp und Mutanten, wurden im Western Blot mit den Antikörpern Anti-ETR1, Anti-TetraHis und Anti-DnaK analysiert (II.3.4). Als Kontrolle wurde das Aliquot eines Zellextraktes von Bakterien aufgetragen, in denen kein Fremdprotein exprimiert worden war. Das Ergebnis ist in Abbildung 3-9 dargestellt. In allen Proben konnte sowohl über den N-terminalen Histidinanker (Anti-TetraHis) als auch mit den ETR1 spezifischen Antikörpern die gereinigte Proteinbande detektiert werden. Unspezifische Reaktionen dieser beiden Antiköper mit bakteriellen Proteinen des Zellextrakts konnten nicht beobachtet werden (Abb. 3-9A+B, Spur 6). Das Hitzeschockprotein DnaK wurde nur im *E. coli* Zellextrakt nachgewiesen (Abb. 3-9C, Spur 6).

Der isoelektrische Punkt (pI) der gereinigten Proteine ETR1, ETR1, ETR11-609 und ETR1165-738 wurde mit Hilfe einer isoelektrischen Fokussierung wie unter II.3.6 beschrieben durchgeführt. Im gefärbten Gel (Abb. 3-10) erkennt man alle drei Proteine etwa auf einer Höhe. Ihnen konnte ein pI-Wert von etwa 7,4 bis 7,9 zugeordnet werden. Dies entspricht etwa den theoretischen pI-Werten 7,2, 7,7 und 8,1 der drei Proteine (II.3.6).

Abbildung 3-9

Western Blot Analyse aller unter denaturierenden Bedingungen gereinigten Proteinpräparationen



Alle im Rahmen dieser Arbeit gereinigten Varianten an ETR1 Protein wurden in Western Blot Analysen untersucht, die in Abbildung 3-10 gezeigt sind. Eingesetzt wurden die Antikörpern Anti-ETR1 gegen Cterminale Epitope des Rezeptorproteins (A), Anti-His gegen den N-terminalen Histidinanker (B) und Anti-DnaK gegen das Protein DnaK (C), das in der nativen ETR1 Proteinpräparation als erhebliche Verunreinigung detektiert wurde. In der abgebildeten Ponceaufärbung des Anti-His Western Blots ist der Proteintransfer vom Gel auf die Membran belegt (D). Der Probenauftrag auf ein SDS Gel erfolgte zuvor nach dem Schema M – Dual Color Standard, Spur 1 – ETR1, Spur 2 - ETR1₁₋₆₀₉ Spur 3 – $ETR1_{H353A}$, Spur 4 - $ETR1_{164-738}$, Spur 5 - $ETR1_{164-738}$ H353A. Als Kontrolle wurde in Spur 6 der Gesamtproteinextrakt eines Zellaufschlusses von Bakterien eingesetzt, die kein ETR1 Protein exprimiert hatten. Nur in dieser Spur wurde DnaK detektiert, Mit Anti-ETR1 und Anti-His Antikörpern wurde in dieser Spur kein Protein detektiert, was die hohe Spezifität dieser Antikörper unterstreicht.

Abbildung 3-10:

IEF Analyse der Proteine ETR1, ETR11-609 und ETR1164-738



In Abbildung 3-10 ist die IEF Analyse der renaturierend gereinigten Proteine ETR1 (Spur 1), ETR1₁₋₆₀₉ (Spur 2) und ETR1₁₆₄₋₇₃₈ (Spur 3) dargestellt. Anhand des IEF Standards, der an der Seite markiert ist, konnte für alle drei Proteine ein isoelektrischer Punkt (pI) von etwa 7,4 bis 7,9 ermittelt werden.

III.5 Untersuchung zur Sekundärstruktur

Mit Hilfe der Zirkular Dichroismus (CD) Spektroskopie lassen sich die vorhandenen Sekundärstrukturanteile eines Proteins abschätzen (II.4). Alle in der Probe vorliegenden Proteine tragen dabei zu dem CD-Spektrum bei. Deshalb muss das zur Charakterisierung eingesetzte Protein in einer hohen Reinheit vorliegen.

Diese Voraussetzung erfüllten die nach dem denaturierenden Protokoll gereinigten Proteine. Die Messung der Sekundärstrukturanteile dieser renaturierten Proteine erlaubte außerdem eine Beurteilung des Faltungszustandes. Das Vorhandensein von α -Helices und β -Faltblättern war ein Argument für eine erfolgreiche Rückfaltung in die native Struktur. Der Vergleich der berechneten prozentualen Anteile (Tabelle 3-1) mit Sekundärstrukturvorhersagen anhand der Sequenzvorhersage und Literaturwerten für bekannte Strukturen homologer Proteine (Tabelle 4-1) stützen diese Interpretation. Die unterschiedliche Domänenzusammensetzung der ETR1, ETR1_{1.-609} und ETR1₁₆₅₋₇₃₈ Proteine erlaubte außerdem indirekte Rückschlüsse auf die einzelnen Domänen. Die gemessenen Spektren der drei Proteine sind in Abbildung 3-11 dargestellt.

Typisch für Spektren α-helicaler Proteine sind je ein Minimum bei etwa 208 und 222 nm. Besonders die starke Ausprägung des Minimums um 222 nm impliziert einen erhöhten α-helicalen Anteil. Spektren von β-Faltblättern weisen ein Minimum um 215 nm auf (Abb. 2-1). Deutlich zu erkennen ist, dass die in Abbildung 3-11 dargestellten Spektren zwei Minima bzw. ein Minimum und eine Schulter zwischen 208 und 222 nm aufweisen und die Ordinate bei ungefähr 201 nm schneiden. Dies spricht dafür, dass alle drei Proteine eine überwiegend α-helicale Sekundärstruktur aufweisen. Im Spektrum des ETR1₁₆₅₋₇₃₈ Proteins (blau) sind diese zwei Minima am undeutlichsten ausgeprägt. Dies lässt auf einen etwas geringeren α-Helixanteil als bei den Proteinen ETR1 und ETR1₁₋₆₀₉ schließen. Das nur im Spektrum des ETR1₁₆₅₋₇₃₈ Proteins aufgezeichnete Maximum bei 196 nm stimmt ebenfalls etwas besser mit dem für α-Helices bestimmten Maximum von 195 nm als mit dem für β-Faltblätter bei 198 nm überein.

Abbildung 3-11:



CD-Spektren der Proteine ETR1, ETR1₁₋₆₀₉ und ETR1₁₆₄₋₇₃₈

Die Abbildung 3-11 zeigt die aufgezeichneten CD-Spektren der Proteine ETR1(rot), ETR1₁₋₆₀₉ (grün), ETR1₁₆₄₋₇₃₈ (blau). Alle Werte wurden anhand der jeweiligen Proteinkonzentration Probe in Elliptizität bezogen auf die mittlere Aminosäuremolmasse (Θ_{MRW}) genormt, was einen Vergleich der verschiedenen Spektren miteinander erlaubt.

Deutlich zu erkennen ist in allen drei Spektren, dass klare Sekundärstrukturen vorhanden sind. Die Prozessierung der CD-Spektren mit dem Programm k2d [71,72] ergab die in der Tabelle 3-1 aufgeführten prozentualen Sekundärstrukturanteile. Bei einer Fehlerstreuung von maximal 5 % werden den Proteinen ETR1 und ETR1₁₋₆₀₉ eine α -Helixanteil von knapp 40 % und dem ETR1₁₆₅₋₇₃₈ Protein ein Anteil von etwa 30 % zugeordnet.

	a-Helix	β-Faltblatt	ungeordnet
		-	(umfasst Schleifenbereiche und flexible Strukturen, kein denaturiertes Protein[70])
ETR1	40 %	20 %	40 %
ETR1 ₁₋₆₀₉	37 %	19 %	44 %
ETR1 ₁₆₅₋₇₃₈	29 %	23 %	52 %

Tabelle 3-1: mit k2d [71-72] berechnete Sekundärstrukturanteile

III.6 Untersuchungen zur Histidinkinaseaktivität

In dieser Arbeit ist es gelungen, ETR1 inklusive der Membrandomäne zu exprimieren und zu reinigen. Damit war es erstmals möglich, vollständiges ETR1 Protein bezüglich der Histidinkinaseaktivität zu untersuchen und damit auch die Regulation dieser Aktivität durch die Sensordomäne zu analysieren. In dieser Arbeit durchgeführte Phosphorylierungsexperimente wurden deshalb auch in Gegenwart von Agonisten und Antagonisten des Ethylenrezeptorproteins gemessen. Anstelle des leicht flüchtigen Ethylens wurde der Ethylenagonist Cyanid, der in der Natur die gleiche Wirkung wie Ethylen auf Pflanzen hat [7,76,77], in Form von KCN verwendet. Ein bekannter Antagonist ist 1-Methylcyclopropen (MCP) [78,79]. Pflanzen zeigen nach Behandlung mit dieser Substanz keine Reaktion mehr auf Ethylen. In Verdrängungsexperimenten mit Ethylen an ETR1 und ERS1 Protein wurde die antagonistische Wirkung ebenfalls gezeigt und auf die Membrandomäne eingegrenzt [39,40]. Die strukturelle Ähnlichkeit zu Ethylen (Abb. 3-12) legt darüber hinaus nahe, dass MCP an exakt derselben Bindungsstelle in der Membrandomäne die Bindung von Ethlyen oder eines Agonisten verhindert und eine Signalweitergabe von der Sensordomäne an die Ausgabedomäne stört [39], doch zunächst wurde die Metallionenspezifität der Kinaseaktivtät untersucht.

Abbildung 3-12:

Strukturformel der Moleküle Ethylen, Cyanid und MCP



III.6.1 Die Histidinkinaseaktivität ist abhängig von Mn²⁺-Ionen

In den in dieser Arbeit durchgeführten Aktivitätsmessungen wurden verschiedene Proteine eingesetzt, deren Reinigung in II.5 beschrieben ist. Die detaillierte Durchführung aller Messungen ist in II.3.8 dokumentiert. Die in der Radiographie eingesetzten Proteinmengen wurden entweder immunologisch oder durch die Färbung der Membran, auf die die Proteine transferiert worden waren, verifiziert. Wie sich herausstellte, enthielten erste, mit unter nativen Bedingungen gereinigtem Protein (II.5.3) durchgeführte Messungen eine Kontamination an DnaK Protein. Dies war in sofern problematisch, da DnaK ebenfalls eine Autokinaseaktivität besitzt [80-83]. Weil die Molekulargewichte beider Proteine ähnlich sind, ließen sie sich in der SDS PAGE nicht trennen und konnten deshalb in der anschließenden Radiographie nicht unterschieden werden. Insbesondere die Messungen zur Metallionenabhängigkeit der Autokinaseaktivität wurden deshalb mit renaturiertem Protein wiederholt.

ETR1 Protein

In Abbildung 3-13 ist das Ergebnis sowohl von Messungen mit renaturiertem ETR1 (Abb. 3-13A) als auch mit unter nativen Bedingungen gereinigtem ETR1 Protein (Abb. 3-13B) dargestellt. Diese wurden in der Gegenwart verschiedener zweiwertiger Metallionen durchgeführt. In Gegenwart von Mn²⁺-Ionen ist jeweils die deutlich höchste Aktivität erkennbar. In Gegenwart von Mg²⁺-Ionen wurde jeweils die geringste Aktivität gemessen. Auffällig ist, dass in Abwesenheit jeglicher Metallionenkofaktoren immer noch eine Phosphorylierungsreaktion in den gemessenen Proben nachgewiesen werden konnte. Mit renaturiertem ETR1 Protein (Abb. 3-13A) fiel diese in mehreren durchgeführten Messungen mal stärker und mal schwächer aus. Sie war mindestens etwas höher als in Gegenwart von Mg²⁺-Ionen (Spur 2), zeigte jedoch maximal 50 % der Aktivität in Gegenwart von Mn²⁺-Ionen (Spur 3).

In Gegenwart von Ca²⁺-Ionen wurde bei dem unter nativen Bedingungen gereinigten Protein eine deutlich erhöhte Aktivität gemessen. Da diese nicht beim renaturierten ETR1 Protein beobachtetet werden konnte, wurde sie auf das DnaK Protein zurückgeführt. Dies stimmt mit den in der Literatur beschriebenen Untersuchungen zur Metallionenspezifität der Autokinaseaktivität des DnaK Proteins überein [81]. Dort wurde aber auch eine von Mn²⁺-Ionen abhängige Aktivität beschrieben. Deshalb ließ sich die in Abbildung 3-13B in Spur 2 gezeigte Phosphorylierungsreaktion nicht ausschließlich dem ETR1 Protein zuordnen. Man kann die sehr hohe Signalintensität als Summe der Aktivität beider Proteine deuten. Die durchgeführten Messungen mit renaturiertem ETR1 Protein enthielten allerdings keine Verunreinigungen durch fremde Proteine und die beobachteten Aktivitäten konnten somit nur auf die Kinase-

Abbildung 3-13:

Metallionenspezifität der Kinaseaktivität des ETR1 Proteins



Metallionen mit ETR1 Protein dargestellt. Abbildung 3-13A zeigt die Radiographie von Messungen mit renaturiertem Protein und Abbildung 3-13B die mit nativ gereinigtem Protein. Die aufgetragenen Proteinmengen wurden über eine Ponceaufärbung der Membran verifiziert. Lediglich bei nativ gereinigtem Protein wurde das ETR1 Rezeptorprotein aufgrund der vorhandenen Verunreinigung durch DnaK immunologisch mit ETR1 Antikörpern detektiert. Als Proteinstandard ist Dual Colo der Firma, BioRad eingesetzt worden (M).

Abbildung 3-14:

Spezifität der Kinaseaktivität der Proteine ETR11-609 und ETR1164-738



Die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen in Gegenwart verschiedener Metallionen mit $ETR1_{1-609}$ und $ETR1_{164-738}$ Protein sind in Abbildung 3-14 dargestellt. Abbildung 3-14A zeigt die Radiographie von Messungen mit $ETR1_{1-609}$ Protein und Abbildung 3-14B die mit $ETR1_{164-738}$ Protein. Die aufgetragene Proteinmengen wurden über eine Ponceaufärbung der Membran verifiziert. Der eingesetzte Proteinstandard war Dual Color,BioRad (M).

aktivität des ETR1 Protein zurückgeführt werden. Diese Experimente (Abb. 3-13A) bestätigten deswegen klar die bereits aus Messungen an Teilbereichen des ETR1 Rezeptors erhaltene Schlussfolgerung, dass die Kinaseaktivität des ETR1 Rezeptorproteins im Wesentlichen von Mn²⁺-Ionen abhängig ist.

ETR11-609 Protein und ETR1165-738 Protein

Bezüglich der Spezifität der Phosphorylierungsreaktion der Histidinkinase in der Gegenwart bestimmter Metallionen unterschieden sich die ETR1₁₋₆₀₉ und ETR1₁₆₅₋₇₃₈ Proteine nicht vom vollständigen ETR1 Protein. Die Ergebnisse entsprechender Messungen mit diesen Proteinen sind in Abbildung 3-14A und B dargestellt. Beide renaturierten Proteine zeigten in Gegenwart von Mn²⁺-Ionen die deutlich höchste Aktivität. In Gegenwart von Mg²⁺-Ionen war die Aktivität wie beim vollständigen Rezeptorprotein am Geringsten. In Abwesenheit jeglicher Metallionen konnte ebenfalls eine Phosphorylierung nachgewiesen werden.

III.6.2 Der Ethylenagonist Cyanid bindet in der Membrandomäne

Entscheidend für die Funktion der Autokinaseaktivität des Ethylenrezeptorproteins ist ihre Regulierbarkeit. Wie bereits ausgeführt, wurde diese bisher noch nicht nachgewiesen. In den in wässriger Lösung durchgeführten Aktivitätsmessungen dieser Arbeit konnte ein sehr deutlicher Effekt durch den Ethylenagonisten Cyanid auf die Mn²⁺-Aktivität des Rezeptors beobachtet werden. Zur Kontrolle und zum Vergleich wurden zwei weitere Messungen durchgeführt. In diesen beiden wurden die Bedingungen gewählt, unter denen in III.6.1 die stärkste (Mn²⁺-Ionen) und die schwächste Phosphorylierungsreaktion (Mg²⁺-Ionen) gemessen wurde. So konnte der Effekt durch den Ethylenagonisten Cyanid objektiv beurteilt werden. Cyanid wurde immer zusammen mit geringen Mengen an CuCl₂ eingesetzt, weil Kupfer für die Bindung von Ethylen essentiell ist [38,41]. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 3-15 dargestellt. Sowohl das ETR1 Protein (Abb. 3-15A) als auch das ETR1₁₋₆₀₉ Protein (Abb. 3-15B) zeigten beide eine deutliche Hemmung der Autokinaseaktivität in Gegenwart von Cyanid. Das beobachtete Signal (Spur 3) war sogar schwächer als das Signal der Aktivität in Gegenwart von Mg²⁺-Ionen. In beiden Proteinen war die sensorische Membrandomäne vorhanden, in der die Bindestelle des Ethylens und seiner Agonisten identifiziert worden war.

Abbildung 3-15:

Effekt des Ethylenagonisten Cyanid auf die Kinaseaktivität



Proteinstandard war Dual Color, BioRad (Spur M).

Das ETR1₁₆₅₋₇₃₈ Protein (Abb. 3-15C) jedoch zeigte keinen Effekt gegenüber Cyanid. Die Signale der Spur 2 (Maximalkontrolle) und der Spur 3 (mit Cyanid) unterschieden sich nicht. Das ETR1₁₆₅₋₇₃₈ Protein umfasste auch nur den löslichen Bereich des ETR1, weshalb dessen Aktivität ohne die Membrandomäne gar nicht regulierbar sein konnte. Die zuvor beobachtete Hemmung war also durch eine spezifische Bindung des Cyanids im Bereich der der Membrandomäne ausgelöst worden.

Die Hemmung durch Cyanid wurde auch bei dem unter nativen Bedingungen gereinigtem, mit DnaK kontaminiertem ETR1 Protein beobachtet. Durch die vorgestellten, mit renaturiertem Protein durchgeführten Phosphorylierungsexperimente konnte ausgeschlossen werden, dass dieser Effekt auf das DnaK Protein zurückzuführen war. Ergebnisse solcher Experimente sind in Abbildung 3-16 dargestellt. Mit diesen wurde auch die Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung durch Cyanid gezeigt (Abb. 3-16B). Während bei niedrigen Konzentrationen bis 2,5 μ M die Aktivität kaum beeinflusst war, nahm mit zunehmender Konzentration die Aktivität des ETR1 Proteins immer weiter ab.

Abbildung 3-16:

Konzentrationsabhängigkeit der Aktivitätsinhibierung durch Cyanid



Die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen in Gegenwart des Ethylenagonisten Cyanid mit unter nativen Bedingungen gereinigtem ETR1 Protein sind in Abbildung 3-16 dargestellt. Abbildung 3-16B zeigt den Effekt von Cyanid auf die Kinaseaktivität in Abhängigkeit von der Konzentration. In allen Messansätzen wurde gleichzeitig 10 mM $MnCl_2$ und 100 μ M $CuCl_2$ eingesetzt. Die aufgetragenen Proteinmengen wurden immunologisch mit ETR1 Antikörpern detektiert.

Abbildung 3-17:

Effekt von MCP auf die Aktivitätsinhibierung durch Cyanid



Abbildung 3-17 zeigt die Ergebnisse von Aktivitätsmessungen in Gegenwart von Cyanid und MCP, einem Ethylenantagonisten. In allen Messansätzen wurde gleichzeitig 10 mM MnCl₂ und 100 μ M CuCl₂ eingesetzt. Die Ergebnisse von Messungen in Gegenwart von nur einem der beiden Stoffe sind in Abbildung 3-17A dargestellt. Abbildung 3-17B zeigt Ergebnisse von Messungen, in denen MCP vor der Zugabe von Cyanid zunächst 10 Minuten mit dem Messanatz inkubiert wurde. Messergebnisse von Ansätzen, die zunächst 10 Minuten mit Cyanid inkubiert wurden bevor MCP zugegeben wurde, sind in Abbildung 3-17C gezeigt. Alle Messungen wurden wie in allen bisher gezeigten Experimenten durch die ATP Zugabe gestartet. Die aufgetragenen ETR1 Rezeptorproteinmengen wurden immunologisch mit ETR1 Antikörpern detektiert.

III.6.3 1-Methylcyclopropen verhindert die Hemmung durch Cyanid

Der in der Agrarindustrie eingesetzte Ethylenantagonist MCP zeigte keinen Einfluss auf die Phosphorylierungsreaktion, wenn er alleine zu einem Reaktionsansatz zugegeben wurde (Abb. 3-17A, Spur 1 und 2), ganz im Gegensatz zu den alleine mit Cyanid inkubierten Messungen (Spur 3).

Ein deutlicher Effekt konnte aber in Experimenten beobachtet werden, in denen MCP gleichzeitig mit Cyanid im Überschuss eingesetzt wurde (Abb. 3-17B und C). Nach der Vorbehandlung mit MCP kam es zu keiner Hemmung der Autokinaseaktivität durch Cyanid. MCP schien dessen Bindung in der Membrandomäne zu verhindern (Abb. 3-17C). Der Antagonist war auch in der Lage, bereits gebundenes Cyanid zu verdrängen und die Autokinaseaktivität des Proteins wiederherzustellen. In Messansätzen, die mit Cyanid vorbehandelt worden waren, konnte nach der Zugabe von MCP eine Aktivität beobachtet werden. (Abb. 3-17B). Die Kontrollmessungen mit Cyanid ohne MCP Behandlung zeigten erwartungsgemäß keine Aktivität.

III.6.4 Welche Aminosäure wird phosphoryliert?

III.6.4.1 H353A Substitution

Zur Klärung der Frage, ob das in Autokinasemessungen mit löslichen Teilbereichen des ETR1 Proteins als Phosphorylierungsziel identifizierte Histidin 353 [11,44] auch im kompletten ETR1 Protein durch die Kinase phosphoryliert wird, wurde dieser Rest durch Alanin substituiert. Durch diesen Austausch sollte keine Phosphatübertragungsreaktion mehr möglich sein. Sowohl ETR1_{H353A} als auch ETR1_{165-738H353A} zeigten in den Phosphorylierungsexperimenten noch ein radioaktives Signal (Abb. 3-18A und B). Dieses war geringer ausgeprägt als bei dem nicht substituierten ETR1 Protein (Abb. 3-13 und 3-14). Im Vergleich mit den anderen Metallionenkofaktoren war die Aktivität in Gegenwart von Mn ²⁺-Ionen mit den Proteinen ETR1_{H353A} aund ETR1_{165-738H353A} etwa gleich. Die Substitution des Histidins schien die Phosphorylierungsreaktion damit deutlich eingeschränkt zu haben. Komplett eliminiert wurde sie in diesen Experimenten aber nicht. Neben der offensichtlich in nicht modifiziertem Protein primär phosphorylierten Aminosäure Histidin 353, kann das Phosphat demnach anscheinend auch auf andere Aminosäuren übertragen werden.
Abbildung 3-18:

Kinaseaktivität der substituierten Proteine ETR1_{H353A} und ETR1_{164-738 H353A}



modifizierten Proteinen $ETR1_{H353A}$ und $ETR1_{164-738} H353A}$ Protein sind in Abbildung 3-18 dargestellt. Abbildung 3-18A zeigt die Radiographie von Messungen mit $ETR1_{H353A}$ Protein und Abbildung 3-18B die mit $ETR1_{164-738} H353A$ Protein. Die aufgetragene Proteinmengen wurden über eine Ponceaufärbung der Membran verifiziert. Der eingesetzte Proteinstandard war Dual Color (Spur M).

III.6.4.2 pH Abhängigkeit der Stabilität der Phosphat Aminosäurebindung

In weiteren Experimenten wurde versucht, die Frage nach dem phosphorylierten Rest über eine Charakterisierung der Stabilität der erfolgten Phosphorylierung zu ergründen. Aus der Literatur ist bekannt, dass Serin, Threonin, Tyrosin und Histidin phosphoryliert werden können [84]. Die Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin bilden mit dem Phosphat eine Esterbindung, die bei saurem und neutralem pH-Wert stabil ist, im Basischen aber hydrolysiert werden kann. Die Phosphoamidatbindung, die zwischen dem Stickstoffatom eines Histidins und dem Phosphoratom des Phosphats gebildet wird, ist jedoch bei basischem und neutralem pH-Wert stabil und im sauren Milieu hydrolysierbar [84].

Aufgrund dieser Kriterien wurden erste Messansätze dahingehend untersucht, ob ein Histidinrest oder ein andere Aminosäure phosphoryliert wurde. Dazu wurde vor der Radiographie das auf eine Membran transferierte Protein einer Aktivitätsmessung in Gegenwart von Mn²⁺-Ionen drei Stunden bei verschiedenen pH-Werten inkubiert (II.3.8.4). Diese Experimente wurden mit renaturiertem ETR1₁₆₅₋₇₃₈ und mit unter nativ gereinigten Bedingungen erhaltenem ETR1 Protein durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-19 dargestellt. In Untersuchungen zum ETR1₁₆₅₋₇₃₈ Protein (Abb. 3-19B) hatte das radioaktive Signal des eingebauten Phosphatrestes nach der Inkubation der mit phosphoryliertem Protein beladenen Transfermembran in basischer Lösung (Spur 3) die gleiche Intensität wie nach der Inkubation in neutraler Lösung (Spur 1). Das Signal von in saurer Lösung inkubierten Membranen (Spur 2) war jedoch deutlich geringer. Dies spricht für eine Säurelabilität der Phosphat-Aminosäurebindung und damit für ein phosphoryliertes Histidin, wie es auch in der Literatur beobachtet wurde [34,44].

Untersuchungen mit unter nativen Bedingungen gereinigtem, vollständigen Protein (Abb. 3-19A) zeigten sowohl bei in saurer als auch in basischer Lösung inkubierten, mit phosphoryliertem Protein beladenen Membranen (Spur 2, 3) eine schwächeres, radioaktives Signal als das der in neutraler Lösung inkubierten Membran (Spur 1). Hier lag anscheinend sowohl eine säurelabile als auch eine baselabile Phosphat-Aminosäurebindung vor. Durch die Kontamination an DnaK in dieser Proteinprobe lassen die Ergebnisse nur bedingt Rückschlüsse zu. Da für das DnaK Protein nur die Phosphorylierung eines Threoninrestes beschrieben wurde, legt die beobachtete Säurelabilität aber die Existenz eines phosphorylierten Histidins im ETR1 Protein nahe.

Abbildung 3-19:





In Abbildung 3-19A sind die Ergebnisse zur Bindungsstabilität von ETR1 Protein und in Abbildung 3-19B die zur Bindungsstabilität von $ETR1_{164-738}$ Protein dargestellt. Nach der Auftrennung der radioaktiven Messansätze in einer SD PAGE war das phosphorylierte Protein auf eine PVDF Membran transferiert worden. Diese war anschließend vor der Radiographie entweder in H₂O, 1M HCl oder 3M NaOH inkubiert worden.

IV Diskussion

Die heterologe Expression und die Reinigung von Membranproteinen stellt bis heute immer noch eine große Schwierigkeit dar. Dies ist aber die unbedingte Voraussetzung für die biochemische Charakterisierung dieser Proteine. Die molekularbiologischen und genetischen Analysen der Ethylenrezeptor Proteinfamilie der letzten Jahre hat zwar viele neue Erkenntnisse über die Funktionsweise der Ethylenwahrnehmung und Signalübertragung ergeben und es wurden viele bisher unbekannte Komponenten identifiziert. Trotzdem sind die Mechanismen, mit denen ein Ethylenreiz zunächst innerhalb des Rezeptorproteins weitergegeben und dann auf weitere Proteine übertragen wird, immer noch vollkommen unklar. Aber nicht nur der Mechanismus dieser Übertragung ist unbekannt, auch über die Zielproteine gibt es sehr unterschiedliche Vorstellungen. Von dem Zusammenspiel der Rezeptoren mit der oder den möglichen Signalübertragungskaskaden existiert nur ein ungenaues Bild. Erste biochemische Untersuchungen an Proteinfragmenten gaben Hinweise darauf, dass die Vorstellung, die man vor allem aus der Sequenzhomologie der Ethylenrezeptoren gewonnen hatte, überdacht werden muss. In dieser Arbeit war es nun zum ersten Mal möglich, funktionelle und strukturelle Charakterisierungen an kompletten ETR1 Rezeptorprotein durchzuführen.

IV.1 Proteinreinigungen

IV.1.1 Verunreinigung der nativen Proteinpräparation durch DnaK

Mit der Entwicklung eines Reinigungsprotokolls unter nativen Bedingungen bot sich die Möglichkeit, das komplette ETR1 Protein in funktionellen Untersuchungen einzusetzen. Dies geschah unter anderem in Messungen der Autokinaseaktivität des ETR1 Protein *in vitro*. In diesen Experimenten ergaben sich Widersprüche hinsichtlich des phosphorylierten Aminosäurerest im ETR1 Protein. Um diesen Rest zu charakterisieren, wurde die chemische Bindung, über die der Phosphatrest in das Protein eingebaut ist, untersucht. Außerdem wurde ETR1 in Messungen eingesetzt, in denen das in der Literatur [44] als Phosphorylierungsziel beschriebene Histidin in Position 353 gegen Alanin substituiert worden war. Mit diesen Methoden lässt sich die phosphorylierte Aminosäure jedoch nicht zweifelsfrei bestimmen, weil es sich um reine Negativkontrollen handelt. Deshalb sollte durch die massenspektrometrische Analyse des phosphorylierten Proteins der oder die phosphorylierten Reste identifiziert werden.

Unerwarteterweise ergaben die Massenspektrometrie und daraufhin weitere im Ergebnisteil unter III.3.3 durchgeführte Analysen, dass die in III.3.1 vorgestellte native Proteinpräparation eine deutliche Verunreinigung des DnaK Proteins aus *E. coli* enthielt. Das DnaK Protein ist ein 70 kDa großes Chaperon und spielt eine Rolle bei Proteinfaltungsprozessen [80,82]. In der Literatur ist für dieses Protein eine Autokinaseaktivität beschrieben, bei der ein Threoninrest im Protein phosphoryliert wird. Diese Aktivität ist von der Gegenwart von Mangan- und Kalziumionen und vom pH Wert abhängig [80,81,83]. Das pH Optimum liegt mit pH 5 bis 6 deutlich niedriger als der pH Wert des eingesetzten Reaktionsmediums (pH 7,5).

IV.1.1.1 Ist ETR1 Protein in der nativen Proteinpräparation vorhanden?

Fragmente des ETR1 Proteins wurden mit den ersten beiden massenspektrometrischen Analysen nicht nachgewiesen. Dies bedeutet aber nicht, dass das Rezeptorprotein nicht in der Probe enthalten ist. Obwohl die Massenspektrometrie als Methode in der Proteinanalytik inzwischen grundsätzlich etabliert ist, ergeben sich Schwierigkeiten bei der Analyse von Membranproteinen. Detergenz, das benötigt wird, um das Protein in Lösung zu halten, kann beim tryptischen Verdau des Proteins entweder dadurch stören, dass es die Aktivität des Trypsins inhibiert oder dass Schnittstellen für die Protease unzugänglich sind. Auch im Messvorgang sind Membranproteine schwer zu handhaben [85-87]. Es ist also plausibel, dass das Rezeptorprotein in ersten massenspektrometrischen Analysen nicht identifiziert werden konnte. Durch die Western Blot Analyse wurde das ETR1 Protein aber zweifelsfrei nachgewiesen sowie eine mögliche Kreuzreaktion des ETR1 Antikörpers mit DnaK Protein ausgeschlossen (Abb. 3-4 und Abb. 3-9).

Durch zusätzliche Reinigungsschritte wurde keine Abtrennung des DnaK Proteins erreicht. Damit konnten mit dieser Präparation keinesfalls strukturelle Untersuchungen durchgeführt werden. In spektroskopischen Experimenten tragen nämlich alle in der Probe enthaltenen Proteine zur Messung bei. Die resultierenden Spektren sind also verfälscht und damit nicht charakteristisch für ein einzelnes Protein. Ebenso ist eine Kristallisation des ETR1 Rezeptors bei einer deutlichen Verunreinigung durch DnaK Protein nicht zu erwarten. Umfangreiche im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte, systematische Kristallisationsexperimente bestätigen diese Vermutung.

IV.1.1.2 Der Einfluss von DnaK auf die Dimerisierungsexperimente

In funktionelle Untersuchungen ist das nach dem nativen Reinigungsprotokoll präparierte ETR1 Protein verwendbar, solange das verunreinigende DnaK Protein die betreffende Messung nicht stört oder beeinflusst.

Da keine kovalente Verknüpfung von DnaK über intrinsische Disulfide bekannt ist, sind die Ergebnisse zur Dimerisierung des unter nativen Bedingungen gereinigten Proteins ausschließlich auf ETR1 zu beziehen. Zudem konnte eine DnaK Dimerisierung in Kontrollexperimenten ausgeschlossen werden.

IV.1.1.3 Der Einfluss von DnaK auf die Kinaseexperimente

Die in der Literatur beschriebene Autokinaseaktivität des DnaK Proteins erschwert eine eindeutige Interpretation der Phosphorylierungsreaktionen bei dem unter nativen Bedingungen gereinigten Rezeptorprotein. Auf der Grundlage von Messungen mit der löslichen Kinasedomäne [34,44] sollte ETR1 in Gegenwart von Manganionen eine Aktivität zeigen. Das Gleiche trifft allerdings auch auf das DnaK Protein zu. Dieses phosphoryliert in Gegenwart von Mangan- und Kalziumionen laut Literatur ein intrinsisches Threonin [83]. Das durch eine solche Phosphorylierungsreaktion ebenfalls radioaktiv markierte DnaK Protein lässt sich wegen des nahezu identischen Molekulargewichtes in einer Radiographie nicht von radioaktiv markiertem ETR1 unterscheiden. Das Signal einer radioaktiven Proteinbande kann beiden Proteinen zugeordnet werden.

Die Ergebnisse der Messungen zur Regulation der Autokinaseaktivität, die mit nativ gereinigtem Protein durchgeführt wurden, haben dagegen trotz der Kontamination der Proteinpräparation mit DnaK eine Aussagekraft über die Eigenschaften des ETR1 Proteins. Als Bindestelle für Ethylen und mögliche Agonisten und Antagonisten kommt nur eine spezielle elektrochemische Umgebung in Frage, in deren Zentrum ein Metallatom koordiniert ist [88]. Für das DnaK Protein ist keine Bindung von Cyanid oder MCP beschrieben worden. Es weist auch keine Domäne auf, deren spezifische Wechselwirkung mit diesen Stoffen beschrieben ist. Das ETR1 Protein dagegen besitzt eine spezielle Stelle in der Membrandomäne, wo an ein koordiniertes Kupfer(I)atom Ethylen, Cyanid, MCP oder ein ähnliches Molekül binden kann [38,41,77]. Ein geringeres radioaktives Proteinsignal, wie es bei nativ gereinigtem Protein in Gegenwart von Cyanid (Abb. 3-16) beobachtet wurde, muss also auf die Veränderung der Autokinaseaktivität des ETR1 Rezeptorporteins zurückzuführen sein. Die antagonistische Wirkung des MCP auf Cyanid kann dann natürlich auch nur die Aktivität des ETR1 Proteins betreffen.

Mit renaturiertem ETR1 Rezeptorprotein konnte der Einfluss des Ethylenagonisten Cyanid zudem in Abwesenheit von DnaK ebenfalls demonstriert werden (Abb. 3-15). Dies bestätigte und unterstrich die dazu angestellten Überlegungen.

IV.1.2 Qualität der renaturierten Proteinpräparation

Die Zerstörung der Sekundär- und Tertiärstruktur eines Proteins bei dessen Denaturierung ist nicht die optimale Methode der Proteinreinigung. Fällt aber das zu reinigende Protein bei seiner Expression als *inclusion bodies* an, kann man es nicht effizient aus den Membranen extrahieren oder lassen sich Verunreinigungen nicht chromatographisch abtrennen, so ist eine Denaturierung möglicherweise der einzige Weg, das Protein zu reinigen. Man kennt inzwischen unterschiedliche, methodische Ansätze, mit denen man das denaturierend gereinigte Protein erfolgreich in seine ursprüngliche Struktur zurückfalten kann [89].

Dies ist auch mit den drei verschiedenen ETR1 Proteinen gelungen, deren Präparation in III.4 vorgestellt wurde. Diese erfolgreiche Rückfaltung wurde letztlich mit der spektroskopischen Analyse der Sekundärstrukturelemente verifiziert. Die gemessene Autokinaseaktivität, die sich durch den Ethylenagonisten Cyanid steuern ließ, ist ein weiterer Beweis für die erfolgreiche Renaturierung der Proteine. Fehl gefaltetes ETR1 sollte keine Phosphorylierungsreaktion zeigen, geschweige denn eine Regulation der Reaktion durch Bindung eines Effektors in der N-terminalen Membrandomäne. Mit der in dieser Arbeit vorgestellten Präparation über einen denaturierenden Reinigungsschritt konnten für strukturelle und funktionelle

Untersuchungen mit 1 bis 4 mg Protein / 10 g Bakterienpellet ausreichende Mengen gewonnen werden.

Die Reinheit dieser Proteinpräparationen konnte in Western Blot Analysen und über den Vergleich des experimentell ermittelten und des theoretisch zu erwartenden isoelektrischen Punktes bestätigt werden (III.4.3, Abb. 9 und 10).

IV.2 ETR1 Protein lässt sich in vitro dimerisieren

Das ETR1 Protein kann über zwei Disulfidbrücken im N-Terminus ein kovalentes Proteindimer bilden. Diese Schlussfolgerung legen Experimente in *Arabidopsis thaliana* sowie mit Zellaufschlüssen von Hefezellen, die ETR1 Protein in geringer Menge exprimierten, nahe [43]. Unter den in dieser Arbeit verwendeten Anzuchtbedingungen in *E. coli* lag ein geringer Teil des Proteins ebenfalls als Dimer vor. Ein Vergleich der Proteinbanden mit dem Größenstandard in der SDS PAGE und die Western Blot Analyse mit ETR1 spezifischen Antikörpern belegt diese Annahme (Abb. 3-4). Im Gegensatz zu den eukaryotischen Organismen Hefe und *A. thaliana* herrschen im Cytoplasma von *E. coli* reduzierende Bedingungen, so dass eine kovalente Dimerisierung nicht begünstigt wird [90,91].

Mit Hilfe von CuCl₂ gelang es *in vitro*, ETR1 in die dimere Form zu überführen. Die in III.3.2 vorgestellten Experimente wurden mit nicht modifizertem ETR1 Protein und ETR1_{C4SC65} Protein, in dem die für die *in vivo* Dimerisierung verantwortlichen Cysteine gegen Serin ausgetauscht waren, durchgeführt. Das ETR1 Dimer mit einer Molekulargewichtsgröße von 150 kDa konnte in Gegenwart des Oxidationsmittels CuCl₂ eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 3-5). Doch auch mit modifiziertem ETR1_{C4SC65} Protein sieht man unter den gleichen Bedingungen eine schwache Bande. Diese könnte durch ein Dimer erklärt werden, das durch die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen zwei anderen Cysteinen des ETR1 Protein gebildet wird. Das ETR1 Rezeptorprotein besitzt noch sieben weitere Cysteine, die mit dem unspezifisch reagierenden CuCl₂ und einem weiteren Cystein eines zweiten Proteins in einer Redoxreaktion reagieren können. Offensichtlich ist dies aber sehr viel seltener der Fall, als die Ausbildung von Disulfidbrücken über die Cysteine 4 und 6, wie es das Experiment des Wildtypproteins im Vergleich zu dem der Mutante zeigt. Damit zwei Cysteine eine Disulfidbrücke ausbilden können, müssen sie nicht nur von außen im Protein sterisch gut zugänglich sein, sondern die beiden miteinander reagierenden Cysteine müssen auch nahe zueinander gebracht werden oder bereits beieinander liegen.

Das ETR1 Protein tendiert möglicherweise bereits aufgrund seiner Struktur zu einer Dimerisierung. Dies wurde jedenfalls für den isoliert exprimierten Antwortregulator des ETR1 Proteins gezeigt [46]. Auch in Kristallstrukturen von bakteriellen Histidinkinasendomänen lagen die Proteine als Dimere vor [92-93]. Wenn die miteinander reagierenden Cysteine schon nahe zueinander orientiert sind, wird die Oxidationsreaktion natürlich begünstigt und man erhält hauptsächlich das über die Cysteine 4 und 6 miteinander verbundene ETR1 Dimer genau wie *in vivo* beobachtet. Dass das verunreinigende DnaK Protein der Proteinpräparation für die Dimerisierung verantwortlich ist, konnte aufgrund des Kontrollexperiments mit ETR1_{C4SC65} Protein ausgeschlossen werden. Das in diesem Kontrollexperiment beobachtete, unspezifische Dimer könnte zwar theoretisch auch auf ein durch Disulfidbrücken verbundenes DnaK Homodimer oder ETR1-DnaK Heterodimer zurückzuführen sein. Dies ist aber sehr unwahrscheinlich, weil das DnaK Protein nur Cystein enthält. Die Proteinbande von 150 kDa der wildtypischen ein Dimerisierungsreaktion ist also eindeutig auf ein ETR1 Homodimer, das über die Cysteine 4 und 6 miteinander verknüpft ist, zurückzuführen.

Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine Dimerisierung *in vitro* möglich ist. Allerdings ist aufgrund der Verunreinigung durch DnaK Protein unklar, wie viel ETR1 Protein nach der Reaktion noch als Monomer vorliegt.

IV.3 Die Sekundärstruktur des ETR1 Proteins

IV.3.1 Proteinrückfaltung

Die erfolgreiche Rückfaltung der denaturierend gereinigten Proteine in ihre native Struktur ist eine notwendige Voraussetzung für deren Charakterisierung. Die Eigenschaften des Lösungsmittels, oxidative oder reduzierende Bedingungen, Detergenzien und andere Additive können den Faltungsprozess unterstützen. Insbesondere bei Membranproteinen spielen letztere eine Rolle, weil der hydrophobe Bereich der Membrandomäne unter hydrophilen Bedingungen besonders geschützt werden muss. Die native Struktur eines Proteins ist allerdings ausschließlich durch seine Aminosäuresequenz determiniert und kann deshalb auch isoliert *in vitro* erfolgen. Der Faltungsprozess folgt den thermodynamischen Regeln, dass sich die Konstellation mit der geringsten inneren Energie einstellt und das ist letztlich die native Tertiärstruktur des Proteins [95,96].

Eine Möglichkeit, die korrekte Faltung eines Proteins zu verifizieren, bietet die CD (Zirkular Dichroismus) spektroskopische Untersuchung der Probe. Die Ausbildung der α -Helices und β -Faltblätter geschieht spontan und steht ganz am Anfang des Faltungsprozesses des Proteins [95,96]. Wenn diese sich nicht bilden, kann das Protein nicht zu seiner korrekten Tertiärstruktur finden. Im Umkehrschluss ist die Existenz solcher Sekundärstrukturen bereits ein gutes Indiz für die korrekte Faltung, weil dadurch die wesentlichen Motive und Kontaktoberflächen im Protein ausgebildet worden waren und es sehr wahrscheinlich ist, dass sich die native Tertiärstruktur des Proteins ausgebildet hat. Der beste Beweis ist natürlich ein Nachweis der Proteinaktivität, wie es im Rahmen der Experimente zur Autokinaseaktivität erfolgte.

IV.3.2 Interpretation der gemessenen CD-Spektren

Die gemessenen CD Spektren der Proteine ETR1, ETR1₁₋₆₀₉ und ETR1₁₆₅₋₇₃₈ (Abbildung 3-11) belegen die Existenz eines erheblichen Sekundärstrukturanteils in den renaturierten Proteinen. Der Anteil an ungeordneter Struktur ist nicht ungewöhnlich hoch, was vor allem mit dem Nulldurchgang der Spektren bei etwa 201 nm belegt wird [68].

Rechnerisch wurde etwa 20 % β -Faltblattgehalt in allen drei Proteinen ermittelt. Ebenso weisen alle drei ETR1 Konstrukte einen überwiegenden Anteil α -Helix von 30 bis 40 % auf. Auffällig ist der erhöhte α -helicale Anteil in den Proteinen ETR1 und ETR1₁₋₆₀₉ gegenüber dem ETR1₁₆₅₋₇₃₈ Protein. Dies entspricht sowohl den beschriebenen Unterschieden der Spektren (III.5) als auch der Erwartung, weil der Anteil an α -Helix in der Membrandomäne, die ETR1₁₆₅₋₇₃₈ fehlt, besonders hoch ist. In der rechnerischen Auswertung ist der ungeordnete Anteil mit 40 bis 50 % recht hoch ermittelt worden (Tabelle 3-1). Aber hierunter fallen bei k2d auch andere Strukturmotive wie z.B. β -Schleifen und flexible Strukturen [70].

Aufgrund einer Sequenzanalyse und dem Vergleich mit den bereits geklärten Strukturen homologer Domänen [35,36,46,97-101] (Tabelle4-1), wurde für das komplette ETR1 Protein ein α -Helixanteil von etwa 43 % erwartet. Dieser dominierende α -Helixgehalt lässt sich durch die typischen zwei Minima, die das Spektrum eines α -helicales Proteins charakterisieren, bereits im CD-Spektrum erkennen. Die rechnerische Auswertung mit dem Programm k2d, das insbesondere für seine Genauigkeit bei der Errechnung des α -Helixanteils bekannt ist, unterstreicht die Interpretation des Spektrums.

	α-Helix
Membrandomäne	65 %
GAF-Domäne	33 %
Histidinkinasedomäne	39 %
Antwortregulatordomäne	44 %
ETR1 Protein	43 %
ETR1 ₁₋₆₀₉ Protein	42 %
ETR1 ₁₆₅₋₇₃₈ Protein	35 %

Tabelle 4-1: α-Helixanteile der Domänen auf Basis homologer Strukturen

IV.3.3 Schlussfolgerungen

Die Höhe des β -Faltblattanteil ist schwieriger zu bestimmen und auch nicht so gut direkt aus einem Spektrum ablesbar. Der ermittelte Anteil von 20 bis 25 % steht jedoch in gutem Einklang mit den vorhandenen Strukturdaten, da in allen homologen Domänen mehrere β -Faltblattstrukturen gefunden wurden [97-101].

Ohne Membrandomäne ergeben sich für das ETR1₁₆₅₋₇₃₈ Protein theoretische α-Helixanteile von 35 %. Zieht man von dem α-Helixgehalten des kompletten Proteins die aus der Kristallstruktur der Antwortregulatordomäne bestimmten Werte des ETR1 ab [46], so erhält man für das ETR1₁₋₆₀₉ Protein Anteile von 42 %. Dies entspricht in etwa den aus den Spektren errechneten Werten von knapp 40 % bzw.

von etwa 30 %. Die Antwortregulatordomäne hat also anscheinend einen etwas höheren, die Membrandomäne einen deutlich höheren α -helicalen Anteil gegenüber dem Rest des Proteins. Aufgrund der gemessenen Daten weisen also Histidinkinasedomäne und die wahrscheinlich als Verbindung fungierende GAF-Domäne gemeinsam einen Strukturanteil von etwa 30 bis 35 % α -Helix auf.

Diese Werte sind allerdings nur Näherungen, da die Strukturdaten der Domänen homologer Proteine nur Anhaltspunkte bieten. Auf der Grundlage der CD-Daten lässt sich festhalten, dass die Rückfaltung der denaturierten Proteine erfolgreich war. Die detaillierte Struktur und damit auch die genauen Anteile der Sekundärstruktur lassen sich für Proteine dieser Größe jedoch nur durch die Röntgenbeugungsanalysen von Proteinkristallen ermitteln.

IV.4 Untersuchungen zur Autokinaseaktivität

Als Sequenzanalysen ergaben, dass ein großer Bereich des löslichen Teils des ETR1 Ethylenrezeptorproteins eine signifikante Homologie zu Histidinkinasen aufweist, lag der Schluss nahe, in der Aktivität dieser Domäne den Mechanismus für die Weitergabe des Ethylensignals an andere Proteine zu sehen. Der aktuellen Vorstellung zufolge könnte die Weiterleitung des Signals entweder analog zu den Zweikomponentensystemen nach der Autophosphorylierung der Histidinkinase durch die Übertragung eines Phosphates auf ein HPt Protein wie z.B. AHP1, AHP2 oder AHP3 erfolgen oder alleine durch Interaktion mit CTR1 eine mögliche MAP Kinasekaskade kontrollieren [16,29].

IV.4.1 Biochemische Untersuchungen sind widersprüchlich und passen nur unvollkommen in die aktuelle Vorstellung der Signalübertragung

Zur Funktion des Proteins und speziell der Kinasedomäne hat es eine Reihe von Untersuchungen gegeben. Neben der Suche nach Proteininteraktionspartnern der Domäne und genetischen Studien an LOF Mutanten von *Arabidopsis thaliana*, gab es auch den Ansatz einer biochemischen Charakterisierung der Kinaseaktivität. Aber diese *in vitro* durchgeführten Phosphorylierungsexperimente konzentrieren sich auf die Frage, ob diese Domäne des ETR1 überhaupt eine Phosphorylierungsreaktion katalysieren kann und welche Sequenzmotive dazu nötig sind [34,44,45]. Weiterreichende Untersuchungen konnten nicht gemacht werden, da dem in diesen Messungen eingesetztem Protein die sensorische Membrandomäne fehlte. Der eigentlichen Frage nach dem Zusammenspiel von Sensordomäne und Ausgabedomäne konnte so nicht auf den Grund gegangen werden.

Trotzdem haben sich aufgrund dieser Messungen Zweifel an der aktuellen Vorstellung der Signalweiterleitung ergeben. Für die lösliche Domäne einiger Ethylenrezeptoren nicht nur aus *A. thaliana* konnte die Phosphorylierung eines Serins nachgewiesen werden [34]. Die Metallionenspezifität spielte dabei teilweise eine Rolle. NTHK2 aus Tabak zeigte in Gegenwart von Mn²⁺-Ionen eine Serinkinase-aktivität und in Gegenwart von Ca²⁺-Ionen eine Histidinkinaseaktivität [48]. NTHK1 zeigte dagegen nur in Gegenwart von Mn²⁺-Ionen eine Aktivität [47]. Für die Ethylenrezeptoren aus *A. thaliana* wurden bisher keine Experimente in Gegenwart von Ca²⁺-Ionen durchgeführt. Aber die löslichen Domänen aller Ethylenrezeptor-proteine aus *A. thaliana* bis auf die des ETR1 Rezeptorproteins zeigten *in vitro* eine Serinkinaseaktivität aufzuweisen, dies jedoch nur in Gegenwart von Mn²⁺ [34]. Es ist also durchaus möglich, dass die Weiterleitung des Ethylensignals durch die Rezeptorproteine anders funktioniert, als man es sich bisher vorstellt. Die Mehrzahl

aller bisher dahingehend untersuchten Rezeptorproteine scheinen jedenfalls eine Serinkinaseaktivität zu besitzen, lediglich das ETR1 Rezeptorprotein zeigte bisher in Gegenwart von Mn²⁺-Ionen ausschließlich eine Phosphorylierung eines Histidins.

IV.4.2 Autokinaseaktivität in Gegenwart verschiedener Metallionen

Zunächst wurde die Metallionenspezifität der Autokinaseaktivität der gereinigten Proteine untersucht. Die Messungen wurden in Gegenwart von Mg²⁺-, Mn²⁺- und Ca²⁺-Ionen durchgeführt. Die in III.6.1 vorgestellten Ergebnisse dieser Experimente ergaben sowohl für das ETR1 Rezeptorprotein als auch für die Proteine ETR1₁₋₆₀₉ und ETR1₁₆₅₋₇₃₈ eine Mn²⁺-Ionen abhängige Autokinaseaktivität. Proben mit Mg²⁺- und Ca²⁺-Ionen zeigten dagegen nur sehr schwache Signale. Auch ohne die Zugabe jeglicher Metallionen konnte eine geringe Aktivität gemessen werden. Das radioaktive Signal dieser Aktivität variierte von Messung zu Messung etwas im Vergleich zu den anderen beobachteten Messsignalen. Eventuell handelte es sich um eine Kontamination durch mit dem ATP in die Messansätze eingeschleppte Mn²⁺-Ionen. Möglich ist auch, dass es sich bei diesen drei schwachen Aktivitäten um eine geringe Hintergrundaktivität der Autokinase handelt. Eine derartige Aktivität ist für Proteinkinasen in der Literatur beschrieben worden, z.B. weist das DnaK Protein eine schwache Autokinaseaktivität in Gegenwart mehrer Metallionen und sogar in deren Abwesenheit auf [81]. Mit bis zu 500 pmol Protein konnte in den hier durchgeführten Messungen etwa zehnmal mehr Protein eingesetzt werden als in den in der Literatur beschriebenen Messungen [34]. Möglicherweise konnte deshalb die sehr schwache Aktivität sowohl ohne Zugabe jedweder Metallionen als auch bei Zugabe von Mg²⁺-Ionen dort nicht detektiert werden. Die beobachtete Autokinaseaktivität in Gegenwart von Ca²⁺-Ionen schien etwas stärker zu sein als die in Gegenwart von Mg²⁺-Ionen. Dies könnte bedeuten, dass auch der Ethylenrezeptor ETR1 genau wie NTHK2 eine Tendenz zur Phosphorylierung in Abhängigkeit von Ca²⁺-Ionen hat.

IV.4.2.1 Die Autokinaseaktivität benötigt primär Mn²⁺-Ionen

Entscheidend ist in den Kinaseexperimenten, dass bei allen drei hier untersuchten Proteinen eine starke Autokinaseaktivität in Gegenwart von Mn²⁺-Ionen gemessen werden konnte. Dass das ETR1 Protein, dem die Membrandomäne fehlt, eine Kinaseaktivität aufweist, wurde bereits in der Literatur beschrieben. Aufgrund der Untersuchung mehrerer, kleinerer ETR1 Fragmente konnte in diesen ersten Experimenten die Autokinaseaktivität auch bereits auf die Histidinkinasedomäne eingegrenzt und damit ausgeschlossen werden, dass eine Antwortregulatordomäne eine notwendige Bedingung für diese Aktivität ist [44,45]. Eine Kinaseaktivität für das komplette ETR1 Rezeptorprotein konnte bisher dagegen nicht gezeigt werden. Aus den in der Literatur beschriebenen Experimenten an ETR1 Fragmenten [44,45] ergibt sich die Aktivität der Kinasedomäne von komplettem ETR1 Protein auch nicht selbstverständlich. Denn wenn die Autokinaseaktivität durch ein Ethylensignal reguliert wird, könnte es durchaus auch sein, dass das ETR1 in Abwesenheit eines solchen Reizes inaktiv ist. Mit den Messungen einer Phosphorylierungsreaktion mit den Proteinen ETR1 und ETR1₁₋₆₀₉ konnte in den unter III.6.1 vorgestellten Experimenten dieser Arbeit jedoch erstmals gezeigt werden, dass das ETR1 Rezeptorprotein eine Autokinase ist, die in Abwesenheit eines Ethylensignals aktiv ist.

- 76 –

IV.4.3 Die Autokinaseaktivität ist regulierbar

Nachdem die Autokinaseaktivität des vollständigen ETR1 Protein bestätigt werden konnte, sollte untersucht werden, ob diese Phosphorylierungsreaktion auch durch Ethylenagonisten oder -antagonisten regulierbar ist. Die dazu durchgeführten Experimente III.6.2 zeigten eine eindeutige Inhibierung der Autophosphorylierung bei ETR1 und ETR1₁₋₆₀₉ Protein in Gegenwart von Cyanid (Abb. 3-15A und B). Diese Inhibierung war konzentrationsabhängig. Während bei niedrigen Cyanidkonzentrationen noch eine Aktivität gemessen werden konnte, fand bei Konzentrationen über 100 μ M kaum noch eine Phosphorylierungsreaktion statt (Abb. 3-15B). ETR1₁₆₅₋₇₃₈ Protein, dem die Membrandomäne fehlte, zeigte dagegen keine Veränderung seiner Aktivität in Gegenwart von Cyanid. Damit war ausgeschlossen, dass es sich um eine unspezifische Wechselwirkung von Cyanid und der Histidinkinasedomäne handelt. Die beobachtete Inhibierung musste durch eine Bindung von Cyanid in der Membranregion verursacht worden sein, weil diese nur in den Proteinen ETR1 und ETR1₁₋₆₀₉ vorhanden war. In Verdrängungsexperimenten mit Ethylen an in Hefemembranen exprimierten Fragmenten der Ethylenrezeptorproteine wurde eine solche Stelle bereits der Membrandomäne zugeordnet [43]. Für die Ethylenbindung ist Kupfer in der Form von CuSO₄ als essentiell beschrieben worden [38,41]. In im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Messungen ohne Kupfer konnte entsprechend keine Inhibierung durch Cyanid beobachtet werden. Die Ergebnisse belegen zum ersten Mal, dass durch die Bindung eines Moleküls in

der N-terminalen Membrandomäne eine Veränderung in der C-terminalen Ausgabedomäne stattfindet. Die Autokinaseaktivität wird durch Cyanid sogar unter die in Gegenwart von Mg²⁺-Ionen noch messbare, bereits sehr schwache Aktivität reguliert.

IV.4.3.1 MCP konkuriert mit Ethylen um die Bindestelle

Die Inhibierung der Phosphorylierungsreaktion in Gegenwart von Cyanid ließ sich komplett unterdrücken, wenn zu dem Messansatz MCP hinzugegeben wurde. MCP wird in der Agrarindustrie bereits seit langer Zeit als Ethylenantagonist eingesetzt und seine Eigenschaft, Pflanzen gegenüber Ethylen insensitiv zu machen, ist hinreichend beschrieben [78,79]. Die antagonistische Wirkung allein belegt aber nicht, dass MCP mit Ethylen um die gleiche Bindungsstelle konkurriert. Es wurde bisher nur aufgrund der molekularen Struktur (Abb. 3-12) angenommen, dass MCP ein kompetitiver Gegenspieler des Ethylens ist. Die in III.6.3 vorgestellten Messungen dieser Arbeit konnten nun erstmals zeigten, dass MCP nicht nur in der Lage war, die Wirkung von Cyanid zu verhindern, sondern dass es sich um einen kompetitiven Gegenspieler handelt. Auch bei Messansätzen, die bereits mit Cyanid inkubiert worden waren, wurde durch die Zugabe von MCP erreicht, dass eine Autokinaseaktivität gemessen werden konnte. MCP muss also das Cyanid aus der Bindestelle in der Membrandomäne verdrängt haben.

Diese Experimente sind der Beleg dafür, dass die Autokinaseaktivität des ETR1 Proteins über eine Bindestelle in der Membrandomäne reguliert wird. An diese Stelle können Reagentien, deren Molekülstruktur der des Ethylen ähnlich sind, binden, wie z.B. die in der Literatur bereits als Ethylenagonisten und -antagonisten beschriebenen Stoffe Cyanid und MCP [7,76-79]. Vermutlich wird durch die Bindung eine Konformationsänderung ausgelöst, die sich durch die GAF-Domäne fortsetzt und in der Kinasedomäne zur Abschaltung der Aktivität führt. Bindung von MCP blockiert die Bindestelle für andere Moleküle, löst aber keine die Aktivität inhibierende Konformationsänderung aus. Die in dieser Arbeit demonstrierten Experimente bieten eine Grundlage zur weiteren Erforschung der Übertragung des Ethylensignals innerhalb des Proteins und auf mögliche Zielproteine. Dieses diskutierte Messprinzip könnte außerdem dazu eingesetzt werden weitere, bisher noch unbekannte Ethylenagonisten und -antagonisten zu identifizieren. Deren Erforschung würde ebenso zu einem genaueren Einblick in den Mechanismus der Ethylenbindung beitragen.

IV.4.4 Wird das Histidin 353 phosphoryliert?

Die Erkenntnis, dass die Autokinaseaktivität des Ethylenrezeptors durch Ethylen reguliert wird, ist ein starkes Argument für eine Schlüsselfunktion bei der Signalweiterleitung. Insbesondere auf dem Hintergrund dieser Ergebnisse ist es von besonderer Bedeutung zu verstehen, welche Aminosäure phosphoryliert wird. Zwar wurde für das ETR1 Protein bisher ausschließlich die Phosphorylierung eines Histidins nachgewiesen [34,44,45], möglich wäre aber durchaus, dass dies nur für eine isolierte Histidinkinase ohne sensorische Membrandomäne gilt. Schließlich weisen alle anderen untersuchten Ethylenrezeptorproteine zumindest zusätzliche bzw. ausschließliche Serinkinaseaktivität auf.

In den Proteinen ETR1 und ETR1₁₆₅₋₇₃₈ wurden deshalb Aminosäuresubstitutionen des Histidins 353 gegen Alanin durchgeführt, welche als die phosphorylierte Aminosäure identifiziert worden war [44]. Die in III.6.3 beschriebenen Aktivitätsmessungen mit beiden veränderten Proteinen ETR1_{H353A} und ETR1₁₆₅₋₇₃₈ H_{353A} zeigten in Gegenwart der Metallionen Mg²⁺, Mn ²⁺, Ca²⁺ und in Abwesenheit jeglicher Metallionen eine schwache Autokinaseaktivität ungefähr gleicher Intensität [Abbildung 3-18]. Diese entsprach etwa der in Messungen der nicht modifizierten Proteine beobachteten Stärke der dort als Hintergrundaktivität eingeschätzten Phosphorylierungsreaktion [Abbildung 3-13A+3-14B, (Spur 2,4)]. Eine starke, von der Gegenwart von Manganionen abhängige Aktivität wurde jedoch nicht beobachtet.

Damit wurde gezeigt, dass es sich in allen mit ETR1 Wildtyp beobachteten Aktivitätsmessungen primär um die Phosphorylierung des Histidins 353 handeln muss. Die Phosphorylierung anderer Aminosäuren durch die Kinasedomäne scheint jedoch möglich zu sein, was mit der Autokinaseaktivität bei den Mutanten ETR1H353A und ETR1_{165-738 H353A} belegt wird. Es ist plausibel, dass bei den in der Literatur beschriebenen Experimenten mit ETR1 Fragmenten, in denen der Histidinrest 353 modifiziert worden war, keine Aktivität messbar war, da die dort verwendeten Proteinkonzentrationen um mindestens den Faktor zehn niedriger als in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten war [34]. Die in dieser Arbeit beobachtete, schwache Phosphorylierungsreaktion bei Protein mit substituierten Histidin in Position 353 zeigt jedoch, dass neben dem Histidin 353 auch andere Aminosäurereste durch die Kinasedomäne phosphoryliert werden können [Abbildung 3-18]. Eine zur Phosphorylierung des Histidins 353 genau umgekehrt regulierte Phosphorylierung eines anderen Restes konnte experimentell ausgeschlossen werden, denn in Gegenwart von Cyanid kam es zu keiner Steigerung der Autokinaseaktivität von modifiziertem ETR1_{H353A} Protein.

IV.4.4.1

Untersuchung der Bindungsstabilität erlaubt keine eindeutigen Rückschlüsse Um zu bestimmen, ob neben Histidin auch Serin, Threonin, bzw. Tyrosin phosphoryliert werden können, wurde die in der Phosphorylierungsreaktion gebildete Aminosäure-Phosphat Bindung untersucht. Die Experimente zur Stabilität dieser gebildeten Bindung in Säure oder Base lieferten jedoch keine eindeutigen Ergebnisse (III.6.4.2). Zwar scheint die Existenz eines Histidinphosphates sich in der Empfindlichkeit der gebildeten Bindung gegenüber Säure zu bestätigen, aber durch dieses Experiment lassen sich verschiedene Phosphat-Aminosäurebindungen jedoch nicht bestimmen. Mit einer massenspektroskopischen Analyse könnte man auch mehrere, phosphorylierte Aminosäuren innerhalb eines Proteins identifizierten. Erste Experimente waren bislang allerdings noch nicht erfolgreich (IV.1.1.1).

IV.4.4.2 Ein Strukturmodell der Histidinkinasedomäne

Eine Serinkinaseaktivität wurde nicht nur innerhalb der zu den Histidinkinasen homologen Familie der Ethylenrezeptorproteine beobachtet. Auch die Familie der Dehydrogenasekinasen zeigt z.B. eine Homologie zu Histidinkinasen, die Kinasefunktion phosphoryliert aber ein Serin [35,36]. In Sequenzvergleichen von der ETR1 Aminosäuresequenz mit den Sequenzen der verzweigt-kettigen-α-Ketosäure Dehydrogenasekinase sowie der Pyruvatdehydrogenasekinase, von denen gelöste Kristallstrukturen existieren, wurde eine Ähnlichkeit von 37 % bzw. 35 % über einen Bereich von 340 Aminosäuren festgestellt [Anhang VI.3].

Mit Hilfe dieser Sequenzvergleiche und des Strukturmodellierungsprogramms *modeller* [http://salilab.org/index.html,102-104] konnte über den Bereich der Aminosäuren 250 bis 589 des ETR1 Proteins ein Strukturmodell erstellt werden. In Abbildung 4-1 ist die Aufsicht in die ATP-Bindetasche dargestellt. Erkennbar ist, dass das Histidin 353 von dem gebundenen γ -Phosphat zu weit entfernt ist, als dass es direkt phosphoryliert werden kann. Dies gleicht der Situation in anderen Histidinkinasen. Der Mechanismus der Phosphorylierungsreaktion von bakteriellen Histidinkinasen besteht z.B. in einer intermolekular Phosphorylierung (trans-Phosphorylierung) von einem Protein des Homodimers durch das zweite Protein, da die Histidinkinasedomäne zur Dimerisierung fähig ist [92-94].

Abbildung 4-1



Aufsicht auf die ATP-Bindetasche des ETR1 Strukturmodells

In Abbildung 4-1 ist das Strukturmodell des monomeren Signalausgabebereichs des Ethylenrezeptorproteins ETR1(Aminosäuren 251 bis 585) gezeigt. Das Modell wurde auf Basis der Homologie zu der geklärten Struktur der verzweigt-kettige- α -Ketosäure-Dehydrogenasekinase erstellt. Die Reste 353 (Histidin), 357 (Threonin), §567 (Serin) und das in der Bindetasche liegende ATP sind farblich besonders gekennzeichnet. Erkennbar sind in dieser Aufsicht das β - und γ -Phosphat des ATPs. Die Phosphorylierung des Histidins 353 erfolgt vermutlich nicht durch eine intramolekulare Übertragung sondern durch eine trans-Phosphorylierung innerhalb eines Proteinhomodimers [92-94].

Abbildung 4-2

benachbarte Phosphorylierungsziele des Histidin 353



Abbildung 4-2 zeigt mit der Domäne, die das zu phosphorylierende Histidin enthält, einen Ausschnitt des Strukturmodells (Abb.4-1). Diese Domäne besteht vermutlich aus vier parallelen α-Helices. Die in der gleichen Helix vorliegenden und gleich ausgerichteten Aminosäuren Threonin 357 und Serin 367 (farbig gekennzeichnet)bieten eine Alternative zur Phosphorylierung des Histidinrestes 353.

Die in diesem Modell ermittelte Anordnung der ATP-Bindetasche zu dem phosphorylierten Histidin legt nahe, dass dieser Mechanismus beim ETR1 ähnlich funktionieren könnte. Das *in vivo* und *in vitro* über Disulfidbrücken verbundene Dimer konnte u.a. in dieser Arbeit gezeigt werden. Mögliche Phosphorylierungsziele müssen in der räumlichen Nähe des Histidins 353 liegen. Abbildung 4-2 zeigt in einem Ausschnitt des berechneten Strukturmodells potentiell phosphorylierbare Serine, Threonine oder Histidine. Insbesondere das Threonin 357 und das Serin 367 liegen nur eine bzw. vier Helixwindungen versetzt in derselben α -Helix wie das Histidin 353. Eine geringfügige Veränderung in der Orientierung der beiden Proteine eines Dimers zueinander könnte bereits zur Phosphorylierung eines dieser beiden Reste anstelle des Histidins führen.

Es ist durchaus möglich, dass es in der Evolution eine Entwicklung der Histidinkinasen zu Serinkinasen gegeben hat und dass ETR1 ein Protein in einer der ersten Entwicklungsstufen dieser Veränderung ist. Aufgrund des präsentierten Strukturmodells wäre eine Serinkinaseaktivität oder auch eine Threoninkinaseaktivität durchaus denkbar.

IV.4.5 Das Verständnis des Übertragungsmechanismus eines Ethylensignals durch die Ethylenrezeptoren steht erst am Anfang

Neben Untersuchungen der Sekundärstruktur wurden in dieser Arbeit vor allem funktionelle Untersuchungen zur Kinaseaktivität und ihrer Regulation vorgenommen. Die durchgeführten Experimente tragen zum Verständnis der Ethylensignalübertragung bei und die dazu entwickelten Methoden bieten zukünftig weiterhin viele Möglichkeiten, das Verständnis dieses Proteins zu vertiefen.

Für ein detailliertes Verständnis ist es entscheidend, die Untersuchung der Regulation der Kinaseaktivität weiter voranzutreiben und sie durch weitere Effektoren und Aminosäuresubstitutionen zu charakterisieren. Eine Analyse der phosphorylierten Aminosäuren ist wichtig, es muss der Einfluss postulierter Interaktionspartner untersucht werden. Auch die Klärung der Bedeutung des Antwortregulators für die Autokinaseaktivität könnte dazu beitragen zu verstehen, wie durch eine Autophosphorylierungsreaktion das Ethylensignal an Zielproteine weitergegeben werden kann. Die Rolle der Dimerisierung muss weiter untersucht werden. Zur Beantwortung dieser Fragen würde natürlich auch die Klärung der Struktur des ETR1 auf der Basis von Proteinkristallen beitragen.

Mit dem hier vorgestellten Messprinzip zur Untersuchung der Regulation der Kinaseaktivität durch die sensorische Membrandomäne sollten auch die anderen auf die Proteine der Ethylenrezeptorfamilie insbesondere in Hinblick Serinkinaseaktivität untersucht werden. Dieses in vitro System erlaubt die schnelle Untersuchung verschiedener modifizierte ETR1 Proteine und die unkomplizierte Analyse von Ethylenagonisten und -antagonisten. Da die Ethylenrezeptoren von A. thaliana in ihrer Funktion miteinander verknüpft zu sein scheinen [49,50], kann durch solche Untersuchungen ein vertieftes Verständnis des Mechanismus der Ethylensignalwahrnehmung und -übermittlung erzielt werden.

V Zusammenfassung

Der molekulare Mechanismus der Ethylenwahrnehmung und der Weiterleitung des Phytohormonsignals in Pflanzen durch den Ethylenrezeptor ETR1 ist weitgehend unklar. Für das Verständnis der Signalübertragung und der Steuerung der durch Ethylen ausgelösten Antworten spielt dessen Klärung aber eine zentrale Rolle. Statt mit indirekten, genetischen Methoden lässt sich die Frage nach dem Mechanismus nur durch direkte Untersuchungen der Funktion und der Struktur am isolierten, vollständigen Protein beantworten.

Zur Klärung dieser Fragestellung wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Reinigungsstrategien entwickelt, um ETR1 in ausreichenden Mengen für strukturelle und funktionelle Untersuchungen zur Verfügung zu stellen.

Mit gereinigten ETR1 Protein wurden Untersuchung zur Sekundärstruktur mittels Zirkular Dichroismus (CD) Spektroskopie durchgeführt. Erste mit dem gereinigten Rezeptorprotein ergaben bislang noch keine streufähigen Kristalle.

In funktionellen Untersuchungen konnte das *in vivo* beschriebene ETR1 Dimer in einem *in vitro* Reaktionsansatz mit gereinigtem, monomeren ETR1 Protein nachgewiesen werden.

Untersuchungen zur Aktivität der Histidinkinasedomäne wiesen die Autokinaseaktivität in Abwesenheit eines Ethylenreizes des kompletten ETR1 Rezeptorproteins nach. Erstmals wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit eine Regulation der Aktivität durch die Ethylenagonisten und –antagonisten Cyanid und MCP belegt. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindungsstelle von Cyanid und MCP in der Membrandomäne des ETR1 liegt und dass die Inhibierung der Aktivität mit Cyanid durch die Verdrängung von MCP aus der Bindungsstelle verhindert werden kann.

Neben der beschriebenen und primär beobachteten Phosphorylierung des Histidins in Position 353 konnte die Phosphorylierung weiterer Aminosäurereste belegt werden. Anhand eines Strukturmodells des löslichen Bereichs des ETR1 Rezeptorproteins wurden mögliche alternative Phosphorylierungsziele ermittelt.

VI Anhang

VI.1 Literaturverzeichnis

1

P Schopfer, A Brennicke (1999) Pflanzenphysiologie 3. Aufl. Springer Verlag

2

FB Abeles (1992) ethylene in plant biology 2nd edtion academic press, san diego

3

Napier R. (2004) Plant hormone binding sites Ann Bot (Lond) **93**; 227-33

4

AB Bleecker, H Kende (2000) Ethylene: a gaseous signal molecule in plants Annu Rev Cell Dev Biol **16**; 1-18

5

SP Burg, EA Stolwijk (1959) A high sensitive katharometer and its application for the measurement of ethylene and other gases of biological importance J Biochem Microbiol Technol Eng **1** 245-59

6

SP Burg Bleecker, EA Burg (1966) Molecular requirements for the biological activity of ethylene Plant Physiol. **42**; 144-152

7

EC Sisler (1979) Measurement of ethylene binding in plant tissue Plant Physiol **64**; 538-42

8

AB Bleecker, JJ Esch, AE Hall, Fi Rodriguez, BM Binder (1998) The ethylene-receptor family from Arabidopsis: structure and function Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **353(1374)**; 1405-12

9

AB. Bleecker, MA Estelle, C Somerville, H Kende (1988) Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana* Science **241**; 1086-1089

P Guzman, JR Ecker (1990) Exploiting the triple response of Arabidopsis to identify ethylene-related mutants Plant Cell **2(6)**; 513-23.

11

C Chang, SF Kwok, AB Bleecker, EM Meyerowitz (1993) Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators Science **262(5133)**;539-44

12

J Hua, C Chang, Q Sun, EM Meyerowitz (1995) Ethylene insensitivity conferred by Arabidopsis ERS gene Science **269(5231)**; 1712-4

13

H Sakai, J Hua, QG Chen, C Chang, LJ Medrano, AB Bleecker, EM Meyerowitz (1998) ETR2 is an ETR1-like gene involved in ethylene signaling in Arabidopsis Proc Natl Acad Sci U S A **95(10)**; 5812-7

14

J Hua, H Sakai, S Nourizadeh, QG Chen, AB Bleecker, JR Ecker, EM Meyerowitz (1998) EIN4 and ERS2 are members of the putative ethylene receptor gene family in Arabidopsis Plant Cell **10(8)**; 1321-32

15

JJ Kieber, M Rothenberg, G Roman, KA Feldmann, JR Ecker. (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

16

Chen YF, Etheridge N, Schaller GE. (2005) Ethylene signal transduction Ann Bot (Lond) **95** 901-15

17

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

18

Chang C, Bleecker AB. (2004) Ethylene biology. More than a gas Plant Physiol. **(136)** 2895-9

19

Alonso JM, Stepanova AN. (2004) The ethylene signaling pathway Science (306) 1513-5

20

Guo H, Ecker JR. (2004) The ethylene signaling pathway: new insights Curr Opin Plant Biol. **(7)** 40-9

Zwerger K, Hirt H. (2001) Recent advances in plant MAP kinase signalling Biol Chem. **382(8)** 1123-31

22

Jonak C, Okresz L, Bogre L, Hirt H. (2002) Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling Curr Opin Plant Biol. **5(5)** 415-24

23

Ouaked F, Rozhon W, Lecourieux D, Hirt H. (2003) A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants EMBO J. **22(6)** 1282-8

24

JM Alonso, T Hirayama, G Roman, S Nourizadeh, JR Ecker (1999) EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis Science (**284**) 2148-52

25

AB Bleecker (1999) Ethylene perception and signaling: an evolutionary perspective Trends plant Sci **4(7)**; 269-274

26

T Urao, K Yamaguchi-Shinozaki, K Shinozaki (2000) Two-component systems in plant signal transduction Trends Plant Sci **5(2)**; 67-74

27

Lohrmann J, Harter K. (2002) Plant two-component signaling systems and the role of response regulators. Plant Physiol. **128(2)** 363-9.

28

Hwang I, Chen HC, Sheen J. (2002) Two-component signal transduction pathways in Arabidopsis. Plant Physiol. **129(2)** 500-15.

29

Grefen C, Harter K. (2004) Plant two-component systems: principles, functions, complexity and cross talk. Planta **219(5)** 733-42

30

A Imamura, N Hanaki, H Umeda, A Nakamura, T Suzuki, C Ueguchi, T Mizuno (1998) Response regulators implicated in His-to-Asp phosphotransfer signaling in Arabidopsis Proc Natl Acad Sci U S A **95(5)**; 2691-6

31

T Suzuki, A Imamura, C Ueguchi, T Mizuno (1998) Histidine-containing phosphotransfer (HPt) signal transducers implicated in His-to-Asp phosphorelay in Arabidopsis Plant Cell Physiol **(12)**; 1258-68

T Urao, S Miyata, K Yamaguchi-Shinozaki, K Shinozaki (2000) Possible His to Asp phosphorelay signaling in an Arabidopsis two-component system FEBS Letters **478**; 227-232

33

Hass C, Lohrmann J, Albrecht V, Sweere U, Hummel F, Yoo SD, Hwang I, Zhu T, Schafer E, Kudla J, Harter K. (2004)

The response regulator 2 mediates ethylene signalling and hormone signal integration in Arabidopsis EMBO J. **23(16)** 3290-302

34

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

35

Machius M, Chuang JL, Wynn RM, Tomchick DR, Chuang DT. (2001) Structure of rat BCKD kinase: nucleotide-induced domain communication in a mitochondrial protein kinase

Proc Natl Acad Sci U S A 98(20) 11218-23

36

Steussy CN, Popov KM, Bowker-Kinley MM, Sloan RB Jr, Harris RA, Hamilton JA. (2001) Structure of pyruvate dehydrogenase kinase. Novel folding pattern for a serine protein kinase J Biol Chem. **276(40)** 37443-50

37

Dutta R, Qin L, Inouye M. (1999) Abstract Histidine kinases: diversity of domain organization Mol Microbiol. **34(4)** 633-40

38

GE Schaller, AB Bleecker (1995) Ethylene-binding sites generated in yeast expressing the Arabidopsis ETR1 gene Science **270(5243)**; 1809-11

39

Hall AE, Findell JL, Schaller GE, Sisler EC, Bleecker AB. (2000) Ethylene perception by the ERS1 protein in Arabidopsis. Plant Physiol. **123(4)** 1449-58.

40

O'Malley RC, Rodriguez FI, Esch JJ, Binder BM, O'Donnell P, Klee HJ, Bleecker AB. (2005) Ethylene-binding activity, gene expression levels, and receptor system output for ethylene receptor family members from Arabidopsis and tomato. Plant J. **41(5)** 651-9.

41

FI Rodriguez, JJ Esch, AE Hall, BM Binder, GE Schaller, AB Bleecker (1999) A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from Arabidopsis Science **283(5404)**; 996-8

AE Hall, QG Chen, JL Findell, GE Schaller, AB Bleecker (1999) The relationship between ethylene binding and dominant insensitivity conferred by mutant forms of the ETR1 ethylene receptor Plant Physiol **121(1**); 291-300

43

GE Schaller, AN Ladd, MB Lanahan, JM Spanbauer, AB Bleecker (1995) The ethylene response mediator ETR1 from Arabidopsis forms a disulfide-linked dimer J Biol Chem. **270(21)**; 12526-30

44

RL Gamble, ML Coonfield, GE Schaller (1998) Histidine kinase activity of the ETR1 ethylene receptor from Arabidopsis Proc Natl Acad Sci U S A **95(13)**; 7825-9

45

Gamble RL, Qu X, Schaller GE. (2002) Mutational analysis of the ethylene receptor ETR1. Role of the histidine kinase domain in dominant ethylene insensitivity Plant Physiol. **128(4)** 1428-38

46

HJ Muller-Dieckmann, AA Grantz, SH Kim (1999.) The structure of the signal receiver domain of the Arabidopsis thaliana ethylene receptor ETR1 Structure Fold Des **7(12)**; 1547-56

47

Xie C, Zhang JS, Zhou HL, Li J, Zhang ZG, Wang DW, Chen SY. (2003) Abstract Serine/threonine kinase activity in the putative histidine kinase-like ethylene receptor NTHK1 from tobacco Plant J. **33(2)** 385-93

48

Zhang ZG, Zhou HL, Chen T, Gong Y, Cao WH, Wang YJ, Zhang JS, Chen SY. (2004) Evidence for serine/threonine and histidine kinase activity in the tobacco ethylene receptor protein NTHK2. Plant Physiol. **136(2)** 2971-81

49

Cancel JD, Larsen PB. (2002) Loss-of-function mutations in the ethylene receptor ETR1 cause enhanced sensitivity and exaggerated response to ethylene in Arabidopsis Plant Physiol. **129(4)** 1557-67

50

Hall AE, Bleecker AB. (2003) Analysis of combinatorial loss-of-function mutants in the Arabidopsis ethylene receptors reveals that the ers1 etr1 double mutant has severe developmental defects that are EIN2 dependent Plant Cell. **15(9)** 2032-41

51

Wang W, Hall AE, O'Malley R, Bleecker AB. (2003) Canonical histidine kinase activity of the transmitter domain of the ETR1 ethylene receptor from Arabidopsis is not required for signal transmission Proc Natl Acad Sci U S A. **100(1)** 352-7

Qu X, Schaller GE. (2004)

Requirement of the histidine kinase domain for signal transduction by the ethylene receptor ETR1. Plant Physiol. **136(2)** 2961-70

53

Binder BM, O'malley RC, Wang W, Moore JM, Parks BM, Spalding EP, Bleecker AB. (2004) Arabidopsis seedling growth response and recovery to ethylene. A kinetic analysis Plant Physiol. **136(2)** 2913-20

54

KL Clark, PB Larsen, X Wang, C Chang (1998) Association of the Arabidopsis CTR1 Raf-like kinase with the ETR1 and ERS ethylene receptors Proc Natl Acad Sci U S A **95(9)**; 5401-6

55

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

56

Gao Z, Chen YF, Randlett MD, Zhao XC, Findell JL, Kieber JJ, Schaller GE. (2003) Localization of the Raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of Arabidopsis through participation in ethylene receptor signaling complexes J Biol Chem. **278(36)** 34725-32

57

Yi-Feng Chen, Melynda D. Randlett, Jennifer L. Findell, and G. Eric Schaller (2002) Localization of the Ethylene Receptor ETR1 to the Endoplasmic Reticulum of Arabidopsis J Biol Chem. **277(22)** 19861-66

58

B Miroux, JE Walker (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

59

Voet-van-Vormizeele J, Groth G. (2003) High-level expression of the Arabidopsis thaliana ethylene receptor protein ETR1 in Escherichia coli and purification of the recombinant protein Protein Expr Purif. **32(1)** 89-94

60

T Maniatis EF Fritsch, J Sambrook (1989) Molecular cloning – a laboratory manual Cold spring harbor, laboratory press

61

RK Saiki, TL Bugawan, GT Horn, KB Mullis, HA Erlich (1988) Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes Nature **324**; 163-166

RK Saiki, DH Gwelfand, S Stoffel, SJ Scharf, R Higuchi, GT Horn, KB Mullis, HA Erlich (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase Science **239**; 487-491

63

UK Laemmli (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 Nature **227**; 680-685

64

J Heukeshoven, R Dernick (1988) Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels Electrophoresis. 9(1); 28-32

65

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

66

H. von Seggern (1992) Photostimulierbare Speicherleuchtstoffe für Röntgenstrahlung, Physik und Anwendung Phys. Bl. **48** 719 - 723

67

Woody RW. (1995) Circular Dichroism Methods Enzymol. **246** 34-71

68

Johnson WC Jr. (1990) Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide Proteins. **7(3)** 205-14

69

Sreerama N., Venyaminov SY., Woody RW. (1999) Estimation of the number of α -helical and β strand segments ion proteins using circular dichroism spectroscopy Protein Science **8** 370 - 380

70

Greenfield NJ. (1996) Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data Anal Biochem. **235(1)** 1-10

71

Andrade, M.A., P. Chacón, J.J. Merelo and F. Morán. (1993) Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism using an unsupervised learning neural network Prot. Eng. **6** 383-390

72

Merelo, J.J., M.A. Andrade, A. Prieto and F. Morán. (1994) Proteinotopic Feature Maps Neurocomputing. **6** 443-454

Purification of membrane proteins JBC Findlay in Protein purification applications – a practical approach, Oxford University Press 1990

74

Jones PC, Jiang W, Fillingame RH. (1998) Arrangement of the multicopy H+-translocating subunit c in the membrane sector of the Escherichia coli F1F0 ATP synthase J Biol Chem. **273(27)** 17178-85

75

Balmer Y, Schurmann P. (2001) Heterodimer formation between thioredoxin f and fructose 1,6-bisphosphatase from spinach chloroplasts FEBS Lett. **492(1-2)** 58-61

76

Solomos T, Laties GG. (1974) Similarities between the Aciotns of Ethylene an Cyanide in Initiating the Climateric ripening of Avocados Plant Physiol. **54** 506-11

77

EC Sisler (1991) Ethylen binding components in plants In *The plant hormone ethylene* ed. AK Mattoo, Jc Suttle; Seite 81-99F; L CRC-Press 81-99

78

Sisler EC, Dupille E, Serek M. (1996) Effect of 1-methylcyclopropen and methylenecyclopropane on ethylene binding and ethylene action on cut carnations Plant Growth Regul **18** 79-86

79

Sisler EC, Serek M, Dupille E. (1996) Comparison of cyclopropene, 1-methylcyclopropen, and 3,3-dimethy<1-cyclopropene as ethylene antagonists in plants Plant growth Regul **18** 169-174

80

Zylicz M, LeBowitz JH, McMacken R, Georgopoulos C. (1983) The dnaK protein of Escherichia coli possesses an ATPase and autophosphorylating activity and is essential in an in vitro DNA replication system Proc Natl Acad Sci U S A **80(21)** 6431-5

81

Barbara L. Dalie1, Diane A. Skaleris, Kathrin Köhle, Herbert Weissbach and Nathan Brot (1990) Interaction of DnaK with ATP: Binding, ydrolysis and Ca+2-stimulated autophosphorylation Biochemical and Biophysical Research Communications Volume 166, Issue 3, 14 February, Pages 1284-1292

Liberek K, Georgopoulos C, Zylicz M. (1988)

Role of the Escherichia coli DnaK and DnaJ heat shock proteins in the initiation of bacteriophage lambda DNA replication

Proc Natl Acad Sci U S A. **85(18)** 6632-6

83

McCarty JS, Walker GC. (1991) DnaK as a thermometer: threonine-199 is site of autophosphorylation and is critical for ATPase activity Proc Natl Acad Sci U S A **88(21)** 9513-7

84

Klumpp S, Krieglstein J. (2002) Phosphorylation and dephosphorylation of histidine residues in proteins Eur J Biochem. **269(4)** 1067-71

85

Kussmann M, Lassing U, Sturmer CA, Przybylski M, Roepstorff P. (1997) Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric peptide mapping of the neural cell adhesion protein neurolin purified by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis or acidic precipitation J Mass Spectrom. **32(5)** 483-93

86

van Montfort BA, Canas B, Duurkens R, Godovac-Zimmermann J, Robillard GT. (2002) Improved in-gel approaches to generate peptide maps of integral membrane proteins with matrixassisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry J Mass Spectrom. **37(3)** 322-30

87

Wu CC, Yates JR 3rd. (2003) The application of mass spectrometry to membrane proteomics Nat Biotechnol. **21(3)** 262-7

88

Hirsch J, DeBeer George S, Solomon EI, Hedman B, Hodgson KO, Burstyn JN. (2001) Raman and extended X-ray absorption fine structure characterization of a sulfur-ligated Cu(I) ethylene complex: modeling the proposed ethylene binding site of Arabidopsis thaliana ETR1 Inorg. Chem **40** 2439-41

89

De Bernardez Clark, E. [1998] Refolding of recombinant proteins Current Opinion Biotechnol. 9, 157-163. **90** Bessette PH, Aslund F, Beckwith J, Georgiou G. (1999) Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm Proc Natl Acad Sci U S A. **96(24)** 13703-8

91

Prinz WA, Aslund F, Holmgren A, Beckwith J. (1997) The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm J Biol Chem. **272(25)** 15661-7

Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. (2000) Two-component signal transduction. Annu Rev Biochem. **69** 183-215

93

Robinson VL, Buckler DR, Stock AM. (2000) Abstract A tale of two components: a novel kinase and a regulatory switch Nat Struct Biol. **7(8)** 626-33

94

West AH, Stock AM. (2001) Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems Trends Biochem Sci. **26(6)** 369-76

95

Dobson CM. (2003) Abstract Protein folding and misfolding Nature. **426(6968)** 884-90

96

White SH. (2003) Translocons, thermodynamics, and the folding of membrane proteins FEBS Lett. **555(1)** 116-21

97

Ho YS, Burden LM, Hurley JH. (2001) Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. EMBO J **19(20)** 55288-5299

98

Tomomori C, Tanaka T, Dutta R, Park H, Saha SK, Zhu Y, Ishima R, Liu D, Tong KI, Kurokawa H, Qian H, Inouye M, Ikura M. (1999) Solution structure of the homodimeric core domain of Escherichia coli histidine kinase EnvZ Nat Struct Biol. **6(8)** 729-34

99

Tanaka T, Saha SK, Tomomori C, Ishima R, Liu D, Tong KI, Park H, Dutta R, Qin L, Swindells MB, Yamazaki T, Ono AM, Kainosho M, Inouye M, Ikura M. () NMR structure of the histidine kinase domain of the E. coli osmosensor EnvZ Nature **396(6706)** 88-92

100

Bilwes AM, Quezada CM, Croal LR, Crane BR, Simon MI. (2001) Nucleotide binding by the histidine kinase CheA. Nat Struct Biol. **8(4)** 353-60

101

Bilwes AM, Alex LA, Crane BR, Simon MI. (1999) Abstract Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase Cell. **96(1)** 131-41

102

M.A. Marti-Renom, A. Stuart, A. Fiser, R. Sánchez, F. Melo, A. Sali. (2000) Comparative protein structure modeling of genes and genomes Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. **29** 291-325

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

104

A. Fiser, R.K. Do, & A. Sali. (2000) Modeling of loops in protein structures Protein Science **9** 1753-1773

105

Lassmann T, Sonnhammer ELL (2002) Quality assessment of multiple alignment programs FEBS Letters **529(2002)** 126-130

106

Lilie, H., Schwarz, E. & Rudolph, R. [1998] Advances in refolding of proteins produced in E. coli Current Opinion Biotechnol. 9, 497-501.

VI.2 Aminosäuresequenzen

VI.2.1 ETR1 Protein

MEVCNCIEPQWPADELLMKYQYISDFFIAIAYFSIPLELIYFVKKSAVFPYRWVLVQFGAFIVLCGATH LINLWTFTTHSRTVALVMTTAKVLTAVVSCATALMLVHIIPDLLSVKTRELFLKNKAAELDREMGLI RTQEETGRHVRMLTHEIRSTLDRHTILKTTLVELGRTLALEECALWMPTRTGLELQLSYTLRHQHPV EYTVPIQLPVINQVFGTSRAVKISPNSPVARLRPVSGKYMLGEVVAVRVPLLHLSNFQINDWPELSTK RYALMVLMLPSDSARQWHVHELELVEVVADQVAVALSHAAILEESMRARDLLMEQNVALDLARR EAETAIRARNDFLAV<u>MNHEMRTPM</u>HAIIALSSLLQETELTPEQRLMVETILKSSNLLATLMNDVLDL SRLEDGSLQLELGTFNLHTLFREVLNLIKPIAVVKKLPITLNLAPDLPEFVVGDEKR<u>LMQIILNIVGNA</u> VKFSKQGSISVTALVTKSDTRAADFFVVPTGSHFYLRVK<u>VKDSGAGIN</u>PQDIPK<u>IFTKF</u>AQTQSLATRS SGGSGLGLAISKRFVNLMEGNIWIESDGLGKGCTAIFDVKLGISERSNESKQSGIPKVPAIPRHSNFTG LKVLVMDENGVSRMVTKGLLVHLGCEVTTVSSNEECLRVVSHEHKVVFMDVCMPGVENYQIALRI HEKFTKQRHQRPLLVALSGNTDKSTKEKCMSFGLDGVLLKPVSLDNIRDVLSDLLEPRVLYEGM

		Sequenzlänge	Molekulargewicht	Isoelektrischer Punkt
ETR1		738 *	82,6 kDa *	7,6
ETR11-609		609 *	68 kDa *	8,1
ETR1165-738		574 *	63,7 kDa *	7,2
	× 1 1 1	6 · · · D I I · · · I	1 01 1 "	10510 "0

* durch den fusionierten Dekahistidinanker um 21 Aminosäuren / 2,5 kDa größer

- SVKT ETR1 Proteinsequenz
- SVKT postulierte Transmembranhelix
- SVKT konservierte Sequenzmotive der Histidinkinasedomäne
- **CSH** als essentiell für die Dimerisierung (C4,C6), die Ethylenbindung (C65, H69) und die Phosphorylierung (H353, T357, S367 und S541) diskutierte Aminosäuren

VI.2.2 ETR1₁₋₆₀₉ Protein

MEVCNCIEPQWPADELLMKYQYISDFFIAIAYFSIPLELIYFVKKSAVFPYRWVLVQFGAFIVLCGATH LINLWTFTTHSRTVALVMTTAKVLTAVVSCATALMLVHIIPDLLSVKTRELFLKNKAAELDREMGLI RTQEETGRHVRMLTHEIRSTLDRHTILKTTLVELGRTLALEECALWMPTRTGLELQLSYTLRHQHPV EYTVPIQLPVINQVFGTSRAVKISPNSPVARLRPVSGKYMLGEVVAVRVPLLHLSNFQINDWPELSTK RYALMVLMLPSDSARQWHVHELELVEVVADQVAVALSHAAILEESMRARDLLMEQNVALDLARR EAETAIRARNDFLAV<u>MNHEMRTPM</u>HAIIALSSLLQETELTPEQRLMVETILKSSNLLATLMNDVLDL SRLEDGSLQLELGTFNLHTLFREVLNLIKPIAVVKKLPITLNLAPDLPEFVVGDEKR<u>LMQIILNIVGNA</u> VKFSKQGSISVTALVTKSDTRAADFFVVPTGSHFYLRVK<u>VKDSGAGIN</u>PQDIPK<u>IFTKF</u>AQTQSLATRS SG<u>GSGLGL</u>AISKRFVNLMEGNIWIESDGLGKGCTAIFDVKLGISERSNESKQSGIPKVPAIPRHSNFTG

VI.2.3 ETR1₁₆₅₋₇₃₈ Protein

TTLVELGRTLALEECALWMPTRTGLELQLSYTLRHQHPVEYTVPIQLPVINQVFGTSRAVKISPNSPV ARLRPVSGKYMLGEVVAVRVPLLHLSNFQINDWPELSTKRYALMVLMLPSDSARQWHVHELELVE VVADQVAVALSHAAILEESMRARDLLMEQNVALDLARREAETAIRARNDFLAV<u>MNHEMRTPM</u>H AIIALS<mark>S</mark>LLQETELTPEQRLMVETILKSSNLLATLMNDVLDLSRLEDGSLQLELGTFNLHTLFREVLNLI KPIAVVKKLPITLNLAPDLPEFVVGDEKR<u>LMQIILNIVGNA</u>VKFSKQGSISVTALVTKSDTRAADFFV VPTGSHFYLRVK<u>VKDSGAGIN</u>PQDIPK<u>IFTKF</u>AQTQSLATRS<mark>S</mark>GGSGLGLAISKRFVNLMEGNIWIES DGLGKGCTAIFDVKLGISERSNESKQSGIPKVPAIPRHSNFTGLKVLVMDENGVSRMVTKGLLVHLG CEVTTVSSNEECLRVVSHEHKVVFMDVCMPGVENYQIALRIHEKFTKQRHQRPLLVALSGNTDKST KEKCMSFGLDGVLLKPVSLDNIRDVLSDLLEPRVLYEGM

VI.3 Sequenzvergleiche

Alle Sequenzvergleiche wurden mit ClustalW 1.83 (http://align.genome.jp) durchgeführt [105].

VI.3.1 ETR1 und ERS1

Sequenz	1:	ETR1		738	Aminosäuren
Sequenz	2:	ERS1		613	Aminosäuren
		→ 81% ähn	lich		→ 67% identisch
ETR1 ERS1		MEVCNCI MESCDCF ** *:*:	EPQWPADELLMKY ETHVNQDDLLVKY *.: *:**:**	QYISI QYISI	DFFIAIAYFSIPLELIYFVKKSAVFPYRWVLVQFGA DALIALAYFSIPLELIYFVQKSAFFPYKWVLMQFGA * :**:*************************
ETR1 ERS1		FIVLCGA FIILCGA **:***	THLINLWTFTTHS THFINLWMFFMHS **:*** * *	SRTVAI	LVMTTAKVLTAVVSCATALMLVHIIPDLLSVKTREL IVMTIAKVSCAVVSCATALMLVHIIPDLLSVKNREL :*** *** *****************************
ETR1 ERS1		FLKNKAA FLKKKAD ***:**	ELDREMGLIRTQE ELDREMGLILTQE ********	ETGRH ETGRH	HVRMLTHEIRSTLDRHTILKTTLVELGRTLALEECA HVRMLTHGIRRTLDRHTILRTTLVELGKTLCLEECA ******* ** *******
ETR1 ERS1		LWMPTRI LWMPSQS ****:::	GLELQLSYTLRHÇ GLYLQLSHTLSHK ** ****:** :)HPVE) IQVGS *	YTVPIQLPVINQVFGTSRAVKISPNSPVARLRPVSG SSVPINLPIINELFNSAQAMHIPHSCPLAKIGPPVG :***:**:**:**.:*.:**
ETR1 ERS1		KYMLGEV RYSPPEV :* **	VAVRVPLLHLSNF VSVRVPLLHLSNF *:******	QINDV QGSDV	WPELSTKRYALMVLMLPSDSARQWHVHELELVEVVA WSDLSGKGYAIMVLILPTDGARKWRDHELELVENVA *.:** * **:****************************
ETR1 ERS1		DQVAVAL DQVAVAL ******	SHAAILEESMRAF SHAAILEESMHAF **********	RDLLME RDQLME	EQNVALDLARREAETAIRARNDFLAVMNHEMRTPMH EQNFALDKARQEAEMAVHARNDFLAVMNHEMRTPMH ***.*** **:*** *::*******************
ETR1 ERS1		AIIALSS AIISLSS ***:***	LLQETELTPEQRI LLLETELSPEQRV ** ****:***:	MVET] MIET] *:**	ILKSSNLLATLMNDVLDLSRLEDGSLQLELGTFNLH ILKSSNLVATLISDVLDLSRLEDGSLLLENEPFSLQ ******** ** ** **********************
ETR1 ERS1		TLFREVI AIFEEVI ::*.**:	NLIKPIAVVKKLE SLIKPIASVKKLS .****** ****.	OITLNI STNLII	LAPDLPEFVVGDEKRLMQIILNIVGNAVKFSKQGSI LSADLPTYAIGDEKRLMQTILNIMGNAVKFTKEGYI *:.*** :.:******* ****:**************
ETR1 ERS1		SVTALVI SIIASIM *: * :	KSDTRAADF KPESLQELPSPEF *. : :.:*	FVVP] FPVLS	TGSHFYLRVKVKDSGAGINPQDIPKIFTKFAQTQSL SDSHFYLCVQVKDTGCGIHTQDIPLLFTKFVQPRTG :.***** *:***:*.**:.**** :****.*.:
ETR1 ERS1		ATRSSGG TQRNHSG : **	SGLGLAISKRFVN GGLGLALCKRFVG	ILMEGN SLMGG3 ** *	NIWIESDGLGKGCTAIFDVKLGISERSNESKQSGIP YMWIESEGLEKGCTASFIIRLGICNGPSSSSGSMAL :****:** ***** * ::***.:*. *
ETR1 ERS1		KVPAIPR HLAAKSÇ ::.* .:	HSNFTGLKVLVME TRPWNW :.	ENGVS	SRMVTKGLLVHLGCEVTTVSSNEECLRVVSHEHKVV
ETR1 ERS1		FMDVCMP	GVENYQIALRIHE	КFTКζ	QRHQRPLLVALSGNTDKSTKEKCMSFGLDGVLLKPV
ETR1 ERS1		SLDNIRD	VLSDLLEPRVLYE	GM	

VI.3.2 ETR1 und ETR2

Sequenz	1:	ETR1	738	Aminosäuren	
Sequenz	2:	ETR2	773	Aminosäuren	
		→ 62 % ähr	ılich	÷	38 % identisch
ਦਾ ਦ 1				MEV	
ETR2		MVKEIAS	SWLLILSMVVFV	SPVLAINGGGYPR	CNCEDEGNSFWSTENILETQRVSDFLIAV *** : .:: * ::: * :***:**:
ETR1		AYFSIPI	LELIYFVKKSAV	FPYRWVLVOFGAF	IVLCGATHLINLWTFTTHSRTVALVMTTA
ETR2		AYFSIP] *****;	ELLYFVSCSNV:**:**	P-FKWVLFEFIAF ::***.:* **	IVLCGMTHLLHGWTYSAHPFRLMMAFTVF ***** ***:: **:::*. : :.:*.
ETR1		KVLTAV	/SCATALMLVHI	IPDLLSVKTRELF	LKNKAAELDREMGLIRTOEETGRHVRMLT
ETR2		KMLTAL\ *:***:*	/SCATAITLITL *****: *: :	IPLLLKVKVREFM	LKKKAHELGREVGLILIKKETGFHVRMLT
ETR1		HEIRSTI	DRHTILKTTLV	ELGRTLALEECAL	WMPTRTGLELOLSYTLR-HOHPVEYTVPI
ETR2		QEIRKSI :***.:*	LDRHTILYTTLV ****** ***	ELSKTLGLQNCAV	WMPNDGGTEMDLTHELRGRGGYGGCSVSM ***. * *::*:: ** : : :*.:
ਸ਼ਾਸਾਹ 1					- KYMI GEWWANDUDI THI SNEOTNDWDET.
ETR2		EDLDVVI : : :	RIRESDEVNVLS	VDSSIARASGGGG	DVSEIGAVAAIRMPMLRVSDFNG :* *.*:*:*:*:*:*:
ETR1		STKRYAI	MVIMIPSDSAR	OWHVHELELVEVV	ADOVAVALSHAATLEESMRARDLLMEONV
ETR2		-ELSYAI **:	ILVCVLPGGTPR	DWTYQEIEIVKVV :* :*:*:*:*	ADQVTVALDHAAVLEESQLMREKLAEQNR ****:***.*****************************
ETR1		ALDLAR	REAETATRARNE	FLAVMNHEMRTPM	HATTALSSLLOETELTPEORLMVETTLKS
ETR2		ALQMAKF **::*:*	RDALRASQARNA	FQKTMSEGMRRPM * .* ** **	HSILGLLSMIQDEKLSDEQKMIVDTMVKT *:*:.* *::*: :*: **::*:
ETR1		SNLLATI	MNDVLDLSRLF	DGSLOLELGTFNL	HTLFREVLNLIKPIAVVKKLPITLNLAPD
ETR2		GNVMSNI	LVGDSMDVP	DGRFGTEMKPFSL	HRTIHEAACMARCLCLCNGIRFLVDAEKS
		.*:::.*	*:.* :*:.	** : *: .*.*	* ::*. : : :.: : : : : .
ETR1		LPEFVVO	GDEKRLMQIILN	IVGNAVKFSKQGS	ISVTALVTKSDTRAADFFVVP
ETRZ		**: ***	5DERRVFQV1LH ***:*::*:*:*	***. ** *: .	GSSLMFKVLKERGSLDRSDHRWAAWRSPA : : :** * * : .
ETR1		TGSHFYI	LRVKVKDSGAGI	NPQDIPKIFTKFA	QTQSLATRSSGGSGLGLAISKRFVN
ETR2		SSADGD\ :.:.	/YIRFEMNVEND	DSSSQSFASVSSR	DQEVGDVRFSGGYGLGQDLSFGVCKKVVQ : : .* *** *** :.:.*:.*:
ETR1		LMEGNIV	VIESDGLGKG	CTAIFDVKLGISE	RSNESKQSGIPKVPAIPR-HSNFTGLKVL
ETR2		LIHGNIS *:.***	SVVPGSDGSPEI : *** :	MSLLLRFRRRPSI : :: .: *	SVHGSSESPAPDHHAHPHSNSLLRGLQVL : *.:* *. * *: :* : **:**
ETR1		VMDENG	/SRMVTKGLLVH	LGCEVTTVSSNEE	CLRVVSHEHKVVFMDVCMPGVE
ETR2		LVDTNDS	SNRAVTRKLLEK .* **: ** :	LGCDVTAVSSGFD ***:**:**	CLTAIAPGSSSPSTSFQVVVLDLQMAEMD ** .:: .:**.:*: *. ::
ETR1		NYQIALE	RIHEKFTKORHC	RPLLVALSGNTDK	STKEKCMSFGLDGVLLKPVSLDNIRDVLS
ETR2		GYEVAME .*::*:*	RIRSRS	WPLIVATTVSLDE **:** : . *:	EMWDKCAQIGINGVVRKPVVLRAMESELR . :** .:*::**: *** * : *
ETR1		DLLEPR	/LYEGM		
ETR2		RVLLQAI :*	DQLL		
VI.3.3 ETR1 und EIN4

Sequenz	1:	ETR1	738	Aminosäuren
Sequenz	2:	EIN4	766	Aminosäuren
		→ 62 % ähnl	ich	→ 38 % identisch
ETR1				MEVCNCIEPQWPADELLMKYQYISDFFIAIAYFSIPL
EIN4		MLRSLGLG	LLLFALLALV	VSGDNDYVSCNCDDEGFLSVHTILECQRVSDLLIAIAYFSIPL *** : : : ::: * :**::*********
ETR1		ELIYFVKK	SAVFPYRWVL	LVQFGAFIVLCGATHLINLWTFT-THSRTVALVMTTAKVLTAV
EIN4		ELLYFISF **:**:.	'SNVP-FKWVL * * ::***	LVQFIAFIVLCGMTHLLNAWTYYGPHSFQLMLWLTIFKFLTAL **** ******* ***: .** : * :* *.**:
ETR1		VSCATALM	ILVHIIPDLLS	SVKTRELFLKNKAAELDREMGLIRTQEETGRHVRMLTHEIRST
EIN4		VSCATAII *****:	LLTLIPLLLK *: :** **.	KWKVRELYLKQNVLELNEEVGLMKRQKEMSVQVRMLTREIRKS . *.***:**:: *:* . :****:**:
ETR1		LDRHTILK	TTLVELGRTL	LALEECALWMPTRTGLELQLSYTLRHQHPVEY-TVPIQLPVIN
EIN4		LDKHMILF **:* **:	TTLVELSKIL	LDLQNSAVWMPNENRTEMHLTHELRANPMRSFRVIPINDPDVV * *::.*:*** *::*:: ** : .: .:**: * :
ETR1		QVFGTSRA	VKISPNSPVA	ARLRP-VSGKYMLGEVVAVRVPLLHLSNFQINDWPELSTKRYA
EIN4		QVRETKVV ** *	/TILRKNSVLA . : ** :*	AVESSGCGGSEEFGPVAAIRMPMLHGLNFKG-GTPEFVDTPYA * . *. :* *.*:*:** **: . **: . **: . **
ETR1		LMVLMLPS	DSARQWHVHE	ELELVEVVADQVAVALSHAAILEESMRARDLLMEQNVALDLAR
EIN4		IMVLVLPS :***:***	ANSRVWTDKE	EIEIAEVVADQVAVAISHASVLEESQLMREKLGIQNRALLRAK *:*:.*********************************
ETR1		REAETAIR	ARNDFLAVMN	NHEMRTPMHAIIALSSLLQETELTPEQRLMVETILKSSNLLAT
EIN4		QNAMMASQ ::* * :	ARNTCQKVMS	SHGMRRPMHTILGLLSMFQSESMSLDQKIIVDALMKTSTVLSA .* ** ***:*:.* *::*:: :*:::*::*::*::*:*:
ETR1		LMNDVLDI	SRLEDGSLQL	LELGTFNLHTLFREVLNLIKPIAVVKKLPITLNLAPDLPEFVV
EIN4		LINDVIDI *:***:*:	SPKDNGKSAL	LEVKRFQLHSLIREAACVAKCLSVYKGYGFEMDVQTRLPNLVV **: *:**:*:*: * ::* * :::: **::**
ETR1		GDEKRLMQ)IILNIVGNAV	VKFSKQGSISVTALVTKSDTRAADFFVVPTGSHFYLRVKV
EIN4		GDEKRTFQ **** :*	<pre> <u> <u> </u> </u></pre>	LDMTDGGKTVTFRVICEGTGTSQDKSKRETGMWKSHMSDDSLG :.::. * :: :. : * ** **:
ETR1		KDSGAGIN	IPQDIPKIFTK	KFAQTQSLATRSSGGSGLGLAISKRFVNLMEGNIWIESD
EIN4		VKFEVEIN	IEIQNPPLDGS	SAMAMRHIPNRRYHSNGIKEGLSLGMCRKLAQMMQGNIWISPK . : :* **.*.::::::::*:*****
ETR1		GLGKGCTA	AIFDVKLGISE	ERSNESKQSG-IPKVPAIPRHSNFTGLKVLVMDENGVSRMVTK
EIN4		SHGQTQSM . *: :	IQLVLRFQTRP : :::	PSIRRSILAGNAPELQHPNSNSILRGLRITLADDDDVNRTVTK* :* *:: :* : **:: : *::.*.* ***
ETR1		GLLVHLGC	EVTTVSSNEE	ECLRVVSHEHKVVFMDVCMPGVENYQIALRIHEKFTKQRH
EIN4		RLLEKLGC ** :***	'EVTAVSSGFE	ECLNALSNVEMSYRVVILDLQMPEMDGFEVAMKIRKFCGH ***:* .::*::*::*::*::*::*::*::*::*::*::*::*::*
ETR1		QRPLLVAI	JSGNTDKSTKE	EKCMSFGLDGVLLKPVSLDNIRDVLSDLLEPRVLYEGM
EIN4		HWPLIIAI : **::**	TASTEDHVRE	ERCLQMGMNGMIQKPVLLHVMASELRRALQTASE *:*:.:*::*:: *** *. : . * *:.

VI.3.4 ETR1 und ERS2

Sequenz	1:	ETR1		738	А	mino	osäui	ren						
Sequenz	2:	ERS2		645	A	mino	osäui	ren						
		→ 57 S	% ähnlich					→ 35	% ide	entisc	h			
ETR1								MEV	CNCTE	P-OW	PADE	LT.MKY	OYTS	ΔΤΤΊΠ
ERS2		MLI	KTLLVQWLVFF	FFFLI	GS	SVVT	AAEDD	GSLSL	CNCDD *** :	EDSL	FSYE:	TILNS	SQKVG * :.	DFLIA **:**
ETR1		IA	YFSIPLELIYF	VKKS-	-A	VFPY	RWVLV	OFGAF	IVLCG	ATHL	INLW	FFTTH	ISRTV	ALVMT
ERS2		IA: ***	YFSIPIELVYF *****:**:**	VSRTN	IVI	PSPYI **	NWVVC .**:	EFIAF :* **	IVLCG ****	MTHL ***	LAGF	ГYGPH *∶.*	IWPWV	MTAVT .:*
ETR1		TAI	(VLTAVVSCAT	ALMLV	/Н	IIPD	LSVK	TRELF	LKNKA	AELD	REMGI	LIRTQ	EETG	RHVRM
ERS2		VFI · ·	<pre>KMLTGIVSFL1 *:**.:** *</pre>	ALSLV	/TI +	LLPL: ::*	LLKAK	VREFM .**::	LSKKT *.:*:	RELD	REVG: **:*	IIMKÇ :* .*)TETS **•	LHVRM ****
ETR1		LTH	HEIRSTLDRHI	TLKTT	CL1	VELG	RTLAL	EECAL	WMPTR	TGLE	LQLS	YTLR-		HQ
ERS2		LT: **	FKIRTSLDRHT :**::*****	TLYTT	۲L1	VELS ***.	KTLGL :**.*	KNCAV ::**:	WIPNE *:*	IKTE *	MNLT] ::*:	HELRE : **	RIDD	ENENE ::
ETR1		HPV	VEYTVPIQLPV	VINQVF	G.	TSRA	VKISP	NSPVA	RLRPV	SGKY	MLGE	VVAVF	VPLL	HLSNF
ERS2		HF(*	GGYAGFSIPIS *:	SESDVV	/R:	IKRSI	EEVNM ::.	ILSPGS ** :	VLASV * ·*	TSRG	KSGP *	TVGIF .*.:*	RVPML	RVCNF ::.**
ETR1		IIO	NDWPELSTKRY	ALMVL	MI	LPSD	SAROW	HVHEL	ELVEV	VADO	VAVA	LSHAA	ILEE	SMRAR
ERS2		KG- :	-GTPEAIHMCY · ** *	AILVC	: 1	LPLR(QPQAW	TYQEL :**	EIVKV *:*:*	VADQ ****	VAVA: ****	ISHAV :***.	/ILEE ****	SQLMR * *
ETR1		DLI	LMEQNVALDLA	ARREAE	ET Z	AIRA	RNDFL	AVMNH	EMRTP	MHAI	IALS	SLLQE	TELT	PE-QR
ERS2		EKI : `	LAEQNRALQVA * *** **::*	ARENAL	LR <i>I</i>	ANQAI * :*	KAAFE : *	QMMSD :*	AMRCP ** *	VRSI :::*	LGLLI :.*	PLILQ .*: :	DGKL	PENQT ** *
ETR1		LMV	/ETILKSSNLI	LATLMN	۵D <i>۱</i>	VLDL	SRLED	GSLQL	ELGTF	NLHT	LFRE	VLNLI	KPIA	VVKKL
ERS2		VIV :::	/DAMRRTSELI *::: ::*:**	JVQLVN	JN7 * :	AGDII · *:	NNG · ··	TIRAA	ETHYF * *	'SLHS .**:	VVKE: ••*	SACVA :	RCLC	MANGF :.: :
ETR1		PI	FLNLAPDLPEF	VVGDE	EKI	RLMO	IILNI	VGNAV	KFSKC	GSIS	VTAL	VTKSI	TRAA	DFFVV
ERS2		GF:	SAEVYRALPDY : :: **::	VVGDD ***:	DRI ::	KVFQ :::*	AILHM **::	LGV :* *	LMNRK	IKGN	VTFW **	VFPES	GNSD	VSERK
ETR1		PT	GSHFYLRVKVK	DSGAG	JII	NPOD	IPKIF	'TKFAO	TOSLA	TRSS	GGSGI	LGLAI	SKRF	VNLME
ERS2		DIÇ	QEAVWRHCYSK : : *	CEYMEV :	/RI	FGFE'	/TAEG :.	EESSS : :.	sssgs :.* :	NLEE	EEENI	PSLNA .*	CQNI .:.:	VKYMQ *: *:
ETR1		CINT	WIESDCIC	KGCTA	1 T Z	איזעש.		RSNEG	KUSGT	DKND	וקסדע	HSNFT		
ERS2		GN1 * * *	IRVVEDGLGLV	*. :.	/VI . : '	FRFQ	LRRSM	MSRGG	GYSGE **	TFRT	STPP: : *	STSH-		
ETR1		NGV	VSRMVTKGLLV	/HLGCE	EV:	TTVS	SNEEC	LRVVS	HEHKV	VFMD	VCMP	GVENY	QIAL	RIHEK
ETR1		FTI	KQRHQRPLLVA	LSGNT	ſDł	KSTKI	EKCMS	FGLDG	VLLKP	VSLD	NIRD	VLSDI	LEPR	VLYEGM

VI.3.5 ETR1 und PDH (Pyruvat Dehydrogenase Kinase)

Sequenz	1:	ETR1	340	Aminosäuren
Sequenz	2:	PDH	407	Aminosäuren 🗦 35% ähnlich
_				
ETR1		VRVPLLHLS	NFQIN	DWPELSTKRYALMVLMLPSDSARQWHVHELEL-
PDH		MRWFRALLKNASLAGAPKYIEH	IFSKFS	PSPLSMKQFLDFGSSNACEKTSFTFLRQELPVR * .: : : : : : : : : : : : : : : : : : :
ETR1		VEVVADQVAVALSHA	AILEE	SMRARDLLMEQNVALDLARREAETAIRARNDFL
PDH		LANIMKEINLLPDRVLSTPSVQ	LVQSW	YVQSLLDIMEFLDKDPEDHRTLSQFTDALVTIR
		::::.*:* : *	: .	::: :** :* :
ETR1		AVMNHEMRTPMHAIIALSSLLQ	ETELT	PE-QRLMVETILKSSNLLATLMNDVLDLSRLED
PDH		NRHNDVVPTMAQGVLEYKDTYG	DDPVS	NQNIQYFLDRFYLSRISIRMLINQHTLIFDGST
		.::.::	: ::	: : ::: : * : *:*: : .
ETR1		GSLQLELGTFNLHTLFREVLNI	IKPIA	VVKKLPITLNLAPDLPEFVVGDEKRLMQIILNI
PDH		NPAHPKHIGSIDPNCSVSDVVK	DAYDM	AKLLCDKYYMASPDLEIQEVNATNATQPIHMVY
				. :*** *. : * :
ETR1		VGNAVKFSKQGSISVTAL	VTKSD	TRAADFFVVPTGSHFYLRVKVKDSGAGINPQDI
PDH		VPSHLYHMLFELFKNAMRATVE	SHESS	LTLPPIKIMVALGEEDLSIKMSDRGGGVPLRKI
		* :: :.::.*.	• • •	
ETR1		PKIFTKFAQTQSLATRSSGGS-	G	LGLAISKRFVNLMEGNIWIESDG
PDH		ERLFSYMYSTAPTPQPGTGGTF	LAGFG	YGLPISRLYAKYFQGDLQLFSMEGFGTDAVIYL
			~	**.**: :.: ::*:: : *
ETR1				LGKGCTAIFDVKLGISERSNE
PDH		KALSTDSVERLPVYNKSAWRHY	QTIQE	AGDWCVPSTEPKNTSTYRVS-
				*. * : * : * .

VI.3.6 ETR1 und BCK (branched-chain-α-Ketoacid-dehydrogenasekinase)

Sequenz Sequenz	1: 2:	ETR1 BCK	340 412	Aminosäuren Aminosäuren → 37%	ähnlich
ETR1 BCK		VRVPLLHLSNFQINDWPELS MILTSVLGSGPRSGSSLWPLLG : * ** *.	TKR SSLSLI :.	YALMVLMLPSDSARQWH LRVRSTSATDTHHVELARERSKTVTS : *:*	IVHELELVE SFYNQSAID .:: . ::
ETR1 BCK		VVADQVAVALSHAAILEESMRA VVAEKPSVRLTPTMMLYSGRSQ ***:: :* *: : :*	RDLLM DGSHL	MEQNVALDLARREAETAIRAR-NDFI LLKSGRYLQQELPVRIAHRIKGFRSI : :**:	AVMNHEMR JPFIIGCNP
ETR1 BCK		TPMHAIIALSSLLQETELTPEQ TILHVHELYIRAFQKLTDFPPI * :*. :*: *	RLMVE' KDQADI : .:	ETILKSSNLLATLMNDVLDLSRLEDG DEAQY-CQLVRQLLDDHKDVVTLLAE .:*: *::* *: *	SLQLELGT GLRESRKH .*: .
ETR1 BCK		FNLHTLFREVLNLIKPIAVV IEDEKLVRYFLDKTLTSRLGIR ::*.* .*: * . :.:	KKLPI' MLATHI •	TLNLAPDLPEFVVGDEKRL HLALHEDKPDFVGIICTRLSPKKII * * * *:**	M EKWVDFAR
ETR1 BCK		QIILNIVGNAVKFSKQGSISVT RLCEHKYGNAPRVRINGHVAAR :: : *** : :* ::	ALVT- FPFIP	KS PMPLDYILPELLKNAMRATMESHLDT	DTRAADFF PYNVPDVV
ETR1 BCK		VVPTGSHFYLRVKVKDSGAGIN ITIANNDVDLIIRISDRGGGIA :. : * :::.* *.**	PQDIP HKDLD :*:	PKIFTKFAQTQSLATRSS DRVMDYHFTTAEASTQDPRISPLFGH ::: . * . :*:	ILDMHSGGQ
ETR1 BCK		GGSGLGLAISKRFVNLME SGPMHGFGFGLPTSRAYAEYLG * *:**. *: :.: :	GNIWI GSLQL(*.: :	LESDGLGKGCTAIFDVKLGISERSNE LQSLQGIGTDVYLRLRHIDGREESFF .:* .: .:. *.*	I- RI

VI.4 massenspektrometrische Analyse



Leu (L) und Ile (I) können im MS aufgrund ihrer identischen Masse nicht unterschieden werden. Lys (K) und Gln (Q) können aufgrund ihrer ähnlichen Massen nicht eindeutig zugeordnet werden.

Vermutetes Protein/e: Die durch einen tryptischen In-Lösungsverdau hergestellten und identifizierten Peptide haben hohe Homologie zu einem Chaperone Protein aus E.coli. Nähere Informationen zu diesem Protein sind dem Beispielspektrum zu entnehmen. Es wurden keine Peptidmassen des ETR1-Proteins gefunden.

Düsseldorf, 18.05.2005

N. Wietliolto

(Dr. Nicola Wiethölter)





Marca Science Accessing		
<pre>view if the initial initial is a set of papeling is a set of a set of</pre>	(MATRIX) (SCIENCE)	Iascot Search Results
<pre>intermediate intermediate product of the second of th</pre>	liee -	Nicola Wiethoolter
<pre>status title ::::::::::::::::::::::::::::::::::::</pre>	Email	: Nicola.Wiethcelter@uni-duesseldorf.de
<pre>backbase in EXEL 2005031 (246153 adgemester B133581 realizes) intering in EXEL 2005031 (246153 adgemester B135881 realizes) intering in EXEL 2005031 (246153 adgemester B135881 realizes) intering in EXEL 2005031 (2461582) adgemester B135881 realizes) intering intering</pre>	Search title MS data file	: E:\Nicola\ETR1\Vormizeele ETR1_In Losungsverdau_1\ETR1_Vormizeele_/50.wiff (sample number 1) : C:\DoKUME-1\nicola\LokALE-1\Temp\maslC6.tmp
<pre>itiguited. http://www.staticher.pdd/subjection banks/pdf/subjection http://www.staticher.pdd/subjection http://www.staticher.pdd/subjection.pdf/subject</pre>	Database	: NCBInr 20050513 (2461633 sequences; 833258581 residues)
Probability Based Mowres Score Test accounts in 10°Lag(7), where P is the probability that the observes multice interment. Test accounts in 10°Lag(7), where P is the probability of the observes the non-log(7) (°0.05). Test accounts are derived findicate identity or extensive homology (°0.05). Test accounts are derived findicate identity or extensive homology (°0.05). Test accounts are derived findicate identity or extensive homology (°0.05). Test accounts are derived findicate identity or extensive homology (°0.05). Test accounts are derived findicate identity or extensive homology (°0.05). Test accounts are derived findicate identity or extensive homology (°0.05). Test accounts are derived findicate identity or extensive homology (°0.05). Test accounts are derived for a count of the findicate identity of the observation of the findicate identity of	Timestamp Significant hi	: 18 May 2005 at 07:43:46 GMT ts: gi[2392263 Chain D, Crystal Structure Of The Nucleotide Exchange Factor Grpe Bound To The Atpase Domain
Probability Based Moves Store Rescore: 10 ⁻¹⁰ (19(2)) where P is the probability that the observed match is a motion event. Edividual ions cores > 30 Middate Bate probability that the observed match is a motion event. Edividual ions cores > 30 Middate Batemby or extrains beamology (P-G05). Petitin necress are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for making protein hits.		
<pre>Instructure is iOPT_optP), where P is the probability that the observed match is a madom event. Individual ions scores > 50 mindaes used minity or extensive homology (%20.50). Total necessare of drived from ions scores as a non-probabilitie basis for making protein hits.</pre>	Probability Ba	sed Mowse Score
Individual ions score: > 58 Mindeae Explicies with significant homology (> CoS); Protein accreas are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for making protein hits.	Ions score is -10*	Log(P), where P is the probability that the observed match is a random event.
<pre>Individual non socres > 0 indicate Menting or defauity formions cores as a non-probabilities taxis for making protein hits:</pre>	Individual ions sc	ores > 38 indicate peptides with significant homology.
<pre>wide is a set of the set of</pre>	Protein scores are	derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.
<pre>build build b</pre>		
<pre>up of the same set of peptides: Sumary Report (E:Nicola/ETRI Vormized: ETRI _ In Losungsverdau _ NETRI _ Vormized: 700 wilf (sample number)] Seie 2 von Sundard scoring @ MudPIT scoring C Ions score cut-off Show sub-sets [Stow pop-ups @ Suppress pop.us C Sort unassigned Decreases Score] Require bold red [] Stow pop-ups @ Suppress pop.us C Sort unassigned Decreases Score] Require bold red [] Stow pop-ups @ Suppress pop.us C Sort unassigned Decreases Score] Require bold red [] Stow pop-ups @ Suppress pop.us C Sort unassigned Decreases Score] Require bold red [] Stow pop-ups @ Suppress pop.us C Sort unassigned Decreases Score] Conct On Include this hit in error tolerant search Conct Oncide (Score 1 Stow Pop-ups C Sort unassigned Decreases Score] Conct Oncide (Score 1 Stow Pop-ups C Sort unassigned Decreases Score] Conct Oncide (Score 1 Stow Pop-ups C Sort unassigned Decreases Score] Conct Oncide (Score 1 Stow Pop-ups C Sort unassigned Decreases Score] Conct Oncide (Score 1 Stow Pop-ups C Sort unassigned Decreases Score] Conct Oncide (Score 1 Stow Pop-ups C Sort unassigned Decreases Score] Conct Oncide (Score 1 Stow Pop-ups C Sort unassigned Decreases Score Pop Bound To The Atpase Domain Of The Molecular Chape Conct Oncide (Score 1 Stow Conce) (Score 1 Stow Conce 1 Stow Pop Lide [] 1123114553 Mass: 6008 Score: 35 Core 1 Stow Score Expect Bank Peptide [] 1123114553 Mass: 6008 Score: 35 Core 1 Stow Score Expect Bank Peptide [] 1123114553 Mass: 6008 Score: 35 Core 1 Stow Score Expect Bank Peptide [] 1123114553 Mass: 6008 Score: 35 Core 1 Stow Score Expect Bank Peptide [] 1123114553 Mass: 9008 Score: 35 Core 1 Stow Score Expect Bank Peptide [] 1123114553 Mass: 9008 Score: 35 Core 1 Stow Score Expect Bank Peptide [] 1123114553 Mass: 9008 Score: 35 Core 1 Stow Score Expect Bank Peptide [] 1123114553 Mass: 9008 Score: 35 Core 1 Stow Score Expect Bank Peptide [] 1123114553 Mass: 9008 Score: 35 Core 1 Stow Expect Mass Peptide [] 1123114553 Mass: 9008 Score: 35 Core Expect Bank Pept</pre>	2] 2 3	
<pre>build build b</pre>	H	
<pre> def de de</pre>	5	
<pre>public definition definition</pre>	And a second	
<pre>build build be b</pre>		
<pre> build build</pre>		

Peptide Summary Report Peptide Summary Report Peptide Summary ■ Significance threshold p< 0.05 Max. number of hits 20 Intp://www.matrixscience.com/cgi/master_reulus.pl?file=./data/20050518/fctu/OHE.dat Intp://www.matrixscience.com/cgi/master_reulus.pl?file=./data/20050518/fctu/OHE.dat Intp://www.matrixscience.com/cgi/master_reulus.pl?file=./data/20050518/fctu/OHE.dat Intp://www.matrixscience.com/cgi/master_reulus.pl?file=./data/20050518/fctu/OHE.dat Intp://www.matrixscience.com/cgi/master_reulus.pl?file=./data/20050518/fctu/OHE.dat Intp://www.matrixscience.com/cgi/master_reulus.pl?file=./data/20050518/fctu/OHE.dat Intp://www.matrixscience.com/cgi/master_reulus.pl?file=./data/20050518/fctu/OHE.dat Standard scoring @ MudPIT scoring C Ions score cut-Off Show sub-sets I Show pop-ups @ Suppress pop-ups © Sort unassigned Decreasing Score ▼ Require bold red Standard Score: S @ Overles matched: 1 Chain 0, Crystal Structure of The Moleculat Change Factor Grpe Bound To The Atpase Domain Of The Molecular Chape C I 751.00 1499.99 1499.76 0.22 0 56 0.012 1 K.ITALONDOLAWOVER.d Proteins matching the same set of peptides: Gli22052536 Mass: 60027 Score: 56 Overles matched: 1 Chaperone Higf(0) and K [Escherichine colic errors] alignificatione field Statistic in colicent asset.det i 000000000000000000000000000000000000	10 20	30 40 50 60 Probability Based Nove Score
<pre>Peptide Summary Report FormatA: Peptide Summary FormatA: Pepti</pre>		Probabilities based invite down a
Image: Peptide Summary Help Significance threshold pc 0.05 Max. number of hits 20 http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=_/data/20050518/FetuOHHE.dat 18.05.200 Peptide Summary Report (E:\Nicola\ETR1\Vormizeclc_ETR1 In Losungsverdau_NETR1_Vormizeclc_750.wiff (sample number 1)) Seite 2 von Standard scoring @ MudPIT scoring C Ions score cut-off C Show sub-sets [Show pop-ups @ Suppress pop-ups C Sort unassigned (Decreasing Score) Require bold red [Standard scoring @ MudPIT scoring C Ions score cut-off C Show sub-sets [Show pop-ups @ Suppress pop-ups C Sort unassigned (Decreasing Score) Require bold red [Standard scoring @ MudPIT scoring C Ions score cut-off C Show sub-sets [Show sub-sets [Chain D, Crystal Structure of The Nucleotide Exchange Factor Grape Bound To The Atpase Domain of The Molecular Chape [Chain D, Crystal Structure of The Nucleotide Exchange Factor Grape Bound To The Atpase Domain of The Molecular Chape [Cerry Observed Mr(capt) Mr(calc) Delta Mise Score Expect Bank Peptide [Cill2011645 Mass: 69065 Score: 56 Cutring Intervention Baperone (NicrobubErf or depredien Schopel I Chapeton Expect Mark Baperone (NicrobubErf or deprediens Earched: 1 Cill20245394 Mass: 69072 Score: 56 Querry Observed Mr(capt) Mc(calc) Delta Mise Score Expect Mark Meptide 1 Cill2025634 Mass: 69073 Scor	Peptide Summ	ary Report
FormatAs [Peptide Summary Help Significance threshold p< 0.05		
Significance threshold p< 005	Format As	Peptide Summary Help
<pre>bttp://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=./dat20050518/fet0/Bited Peptide Summary Report (E:NicolatETR:INVormizeele_ETR:] in Lösungsverdua_NETR:] vormizeele_750.wiff(sample number)) Seite 2 von Sindard scoring @ MudPIT scoring @ Ions score cut-off @ Show sub-sets [Show pop-ups @ Suppress pop-ups @ Sort unassigned @ccreasing Score] Require bold red [Sector Sector Sector</pre>	S	ignificance threshold $p < 0.05$ Max, number of hits 20
<pre>http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=./dat/20050518/fetuOiHE.dat Peptide Summary Report (E:\Nicola\ETR1\Vormizeele_ETR1_In Lösungsverdau_NETR1_Vormizeele_750.wiff (sample number 1)) Seite 2 von Sinndard scoring @ MudPIT scoring @ Ions score cut-off @ Show sub-sets [Show pop-ups @ Suppress pop-ups © Sort massigned Decreasing Score] Require bold red [SolectAut SolectMore Search Selected Error tolerant 1. gi12202283 Mass: 41500 Score: 55 Queries matched: 1 Chain D, Crystal Structure 0f The Nucleotide Exchange Factor Grpe Bound To The Atpase Domain Of The Molecular Chape [Check to include this hit in error tolerant search 2. Tolicon 1499.99 1499.76 0.22 0 56 0.012 1 K.ITAADNODAWVEVK.d Froteins matching the same set of peptide: dil24111453 Mass: 69005 Score: 56 Queries matched: 1 dil2525536 Mass: 69007 Score: 56 Queries matched: 1 dil2525536 Mass: 69007 Score: 56 Queries matched: 1 dil2521338 Mass: 69007 Score: 56 Queries matched: 1 dil2521338 Mass: 69007 Score: 56 Queries matched: 1 dil2551338 Mass: 69007 Score: 56 Queries matched: 1 diptorece Mark (score) Mar(calc) Pelta Miss Score Expect Pank Peptide dil551338 Mass: 69007 Score: 56 Queries matched: 1 diptorece Mark (score) Mar(calc) Pelta Miss Score Expect Pank Peptide dil551338 Mass: 69007 Score: 50 Queries matched: 1 diptorece Mark (score) Mark (score) Iolice Mark Peptide dil500126534 Mass: 74017 Score: 10 Queries matched: 1 diptorece Mark (score) Mark (score) Iolice Mark Peptide dil500126534 Mass: 64017 Score: 10 Queries matched: 1 diptorece Mark (score) Iolice Mark Peptide dil500126534 Mass: 44017 Score: 10 Queries matched: 1 diptorece Mark (score) Iolice Mark Peptide distarece Mark Score Mark Peptide distarece Mark Score Mark Peptide distarece Mark Peptide I Tolice Mark Peptide dista</pre>		
<pre>http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=./data/2005018/Fetu/OHE.dat Peptide Summary Report (E:\Nicola\ETRI\Vormizecle_ETRI] In Losungsverdau_VETRI_Vormizecle_750.wiff (sample number 1)) Seite 2 von Standard scoring @ MudPIT scoring C Lons score cut-off D Show sub-sets C Show pop-ups @ Suppress pop-ups C Sort unassigned Decreasing Score Require bold red C StoctAll SelectNone Search Selected C Error tolerant Standard Scoring C Lons score stock and C Score Stoce Require bold red C StoctAll SelectNone Search Selected C Error tolerant Standard Score Stoce: 56 Queries matched: 1 Chain D, Crystal Structure of The Nucleotide Exchange Factor Grpe Bound To The Atpase Domain of The Molecular Chape C theck to include this hit in error tolerant search Oucery Observed Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Expect Bank Peptide C 1 751.00 1499.99 1499.76 0.22 0 56 0.012 1 K.ITAADNGDAWVEVK.G Protains matching the same set of peptide: dil2d111453 Mass: 69085 Score: 56 Queries matched: 1 chaperone RepT0; Autoregulated heat hock proteins lishing at fishesities at the climate the climate</pre>		
<pre>http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=./data/20050518/FetuOiHE.dat</pre> Peptide Summary Report (E:\Nicola\ETR1\Vormizeele_ETR1 in L6sungsverdau_I\ETR1_Vormizeele_750.wiff (sample number)) Seite 2 von Standard scoring @ MudPIT scoring C ions score cut-off Show sub-sets Show pop-ups @ Suppress pop-ups C Sort unassigned Decreasing Score] Require bold red StectAll SelectNone Search Selected Error tolerant <pre> 1. dail2292283 Mass: 11500 Score: 56 Queries matched: 1</pre>		
<pre>http://www.minitickenet.com/cgrimater_counterprinter_indum Construction (ECNNeola/ETRII)/Vormizeele_750.wiff(sample number 1)) Seile 2 von Standard scoring @ MudPIT scoring C Ions score cut-off Show sub-sets [</pre>		
<pre>Peptide Summary Report (E:\Nicola\ETR1\Vormizecle_ETR1 in Lösungsverdau_NETR1_Vormizecle_750.wiff (sample number 1)) Seite 2 von: Standard scoring @ MudPIT scoring C ions score cut-off Show sub-sets Show pop-ups @ Suppress pop-ups C Sort unassigned Decreasing Score Require bold red SelectAM SelectNone Search Selected Error tolerant . gil2392283 Mass: 41500 Score: 56 Queries matched: 1 Chain D, Crystal Structure of The Nucleotide Exchange Factor Grpe Bound To The Atpase Domain Of The Molecular Chape Check to include this hit in error tolerant search genry Observed Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Expect Eank Peptide [] 1 751.00 1499.99 1499.76 0.22 0 56 0.012 1 K.ITAADNEDAWVEWR.6 Proteins matching the same set of peptides: dil2411453 Mass: 6005 Score: 56 Queries matched: 1 chapterone Firzf0; autorequiated heat shock protein [Shigella flexmeri 2a str. 301] dil2523536 Mass: 62622 Score: 56 Queries matched: 1 Chapterone Firzf0; autorequiated heat shock protein [Shigella flexmeri 2a str. 301] dil25245336 Mass: 62622 Score: 56 Queries matched: 1 Chapterone Firzf0; autorequiated heat shock protein [Shigella flexmeri 2a str. 301] dil5551338 Mass: 62622 Score: 56 Queries matched: 1 Chapterone Firzf0; Microbiliber degradmaß 2-401 2. gil154026534 Mass: 29441 Score: 22 Queries matched: 1 putative oxidoreductase [Nocardia farcinica IFM 10152] Check to include this hit in error tolerant search 3. gil151012663 Mass: 48617 Score: 18 Queries matched: 1 multise [Saccharemyces cerevisiae] Check to include this hit in error tolerant search 3. gil151012663 Mass: 48647 Score: 18 Queries matched: 1 multise [Saccharemyces cerevisiae] Check to include this hit in error tolerant search 3. gil151012663 Mass: 48647 Score: 18 Queries matched: 1 multise [Saccharemyces cerevisiae] Check to include this hit in error tolerant search</pre>	http://wayay.motri	vesience.com/coi/master_results.pl25ies_/data/20050518/FetuOiHF.dat
Standard scoring € MudPIT scoring C Ions score cut-off Show sub-sets Show pop-ups € Suppress pop-ups C Sort massigned Decreasing Score Require bold red Select M Select None Selected Error tolerant 1. gil2392283 Mass: 41500 Score: 56 Queries matched: 1 Chain D, Crystal Structure of The Nucleotide Exchange Factor Grpe Bound To The Atpase Domain Of The Molecular Chape Check to include this hit in error tolerant search Query Observed Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Expect Bank Peptide 7 7 151.00 1 1899.99 1899.76 0.22 0 1899.99 1899.76 0.22 1 1895.0128 Mass: 6005 Score: 56 1 1895.0128 Mass: 6005 Score: 56 1 1895.0129 Mass: 6005 Score: 56 1 1895.0129 Mass: 6005 Score: 56 1 1856.0129 Mass: 60262 Score: 56 2 0 11856.0129 Mass: 60262 2 0 11850.0121 Check	http://www.matri	xscience.com/cgi/master_results.pl?file=/data/20050518/FetuOiHE.dat 18.05.200
Standard scoring @ MudPIT scoring C Ions score cut-Off Show sub-sets Show pop-ups @ Suppress pop-ups C Sort unassigned Decreasing Score Require bold red Select AU Select None Search Selected Perror tolerant 1. dil2392283 Mass: 41500 Score: 56 Queries matched: 1 Chain D, Crystal Structure of The Nucleotide Exchange Factor Grope Bound To The Atpase Domain Of The Molecular Chape Check to include this hit in error tolerant search Query Observed Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Expect Rank Peptide [1 751.00 1499.99 1499.76 0.22 0 56 0.012 1 K.ITAADNGDAWVEVR.G Proteins matching the same set of peptides: dil24111453 Mass: 69085 Score: 56 Queries matched: 1 chaperone Hsp70; autorequiated heat shock protein [fishigel1a filesmeri 2a str. 301] dil26245936 Mass: 69072 Score: 56 Queries matched: 1 Chaperone Hsp70; autorequiated heat shock protein [fishigel1a filesmeri 2a str. 301] dil26245936 Mass: 29441 Score: 22 Queries matched: 1 COG0443: Molecular chaperone [Microbulbifer degradams 2-40] 2. gli54025634 Mass: 29441 Score: 22 Queries matched: 1 putative exidencetaria [Recardia farching II] Check to include this hit in error tolerant search Guery Observed Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Expect Rank Peptide 1 751.00 1499.99 1500.78 -0.79 0 22 30 2 R.LLAWPGGLTVCDTR.A 3. dil50212693 Mass: 40617 Score: 13 Queries matched: 1 YJR136C [Saccharomyces cerevisiae] Check to include this hit in error tolerant search	http://www.matri Peptide Summary	xscience.com/cgi/master_results.pl?file=./data/20050518/FetuOiHE.dat 18.05.200 Report (E:\Nicola\ETR1\Vormizeele ETR1 In Lösungsverdau \VerR1 Vormizeele 750.wiff (sample number 1)) Seite 2 von
<pre>Standard scoring @ MudPIT scoring @ Ions score cut-off @ Show sub-sets [Show pop-ups @ Suppress pop-ups @ Sort unassigned Decreasing Score] Require bold red [SelectAll SelectNone Search Selected [Error tolerant 1. gil2392283 Mass: 41500 Score: 56 Queries matched: 1 Chain D, Crystal Structure Of The Nucleotide Exchange Factor Grpe Bound To The Atpase Domain Of The Molecular Chape [Check to include this hit in error tolerant search Query Observed Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Expect Rank Peptide [1 751.00 1499.99 1499.76 0.22 0 56 0.012 1 K.ITAADNGDAWVEVK.G Proteins matching the same set of peptides: gil24111453 Mass: 69085 Score: 56 Queries matched: 1 chaperone Hsp70; autoregulated heat shock protein [Shiges matched: 1 chaperone [Microbulbifer degradams 2-40]</pre>	http://www.matri Peptide Summary	xscience.com/cgi/master_results.pl?file=/data/20050518/FetuOiHE.dat 18.05.200 Report (E:\Nicola\ETR1\Vormizeele_ETR1_In Lösungsverdau_I\ETR1_Vormizeele_750.wiff (sample number 1)) Seite 2 von
Standard scoring ← MudPHT scoring ← Ions score cut-off p Show sub-sets f Show pop-ups ← Suppress pop-ups ← Sort unassigned Decreasing Score ▼ Require bold red ⊂ SelectAU Selected ⊂ Error tolerant 1. gi12392283 Mass: 41500 Score: 56 Queries matched: 1 Chain D, Crystal Structure of The Nucleotide Exchange Factor Grpe Bound To The Atpase Domain Of The Molecular Chape □ Check to include this hit in error tolerant Search @ 1 751.00 1499.99 1499.76 0.22 0 56 0.012 1 K. ITAADNGDAWYEVK.G Proteins matching the same set of peptides: gi124111463 Mass: 69085 Score: 56 Queries matched: 1 Chaperone Hprofp; subcrequied her tekock protein [Shigella flexmeri 2a str. 301] gi126245936 Mass: 69085 Score: 56 Queries matched: 1 Chaperone protein dnak [Escherichia coli CFP73] gi1485611283 Mass: 68262 Score: 56 Queries matched: 1 Cocod43: Molecular chaperone (Microbulbifer degredans 2-40] 2. gi154026634 Mass: 29441 Score: 22 Queries matched: 1 putative oxidoreductase [Nocardia farcinica IFW 10152] □ Check to include this hit in error tolerant search guery Observed Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Expect Rank Peptide [1 751.00 1499.99 1500.78 -0.79 0 22 30 2 R.LLAWPCGLIVCDTR.A 3. gi151012663 Mass: 48617 Score: 18 Queries matched: 1 Y3R136C [Saccharomyces cerevisiae] □ Check to include this hit in error tolerant search	http://www.matri Peptide Summary	xscience.com/cgi/master_results.pl?file=./data/20050518/FetuOiHE.dat 18.05.200 Report (E:\Nicola\ETR1\Vormizeele_ETR1_In Lösungsverdau_NETR1_Vormizeele_750.wiff (sample number 1)) Seite 2 von
Show pop-ups € Suppress pop-ups C Sort unassigned [Decreasing Score ▼ Require bold red [Select AU Select None Search Selected □ Error tolerant 1. di12292283 Mass: 41500 Score: 56 Queries matched: 1 Chain D, Crystal Structure of The Nucleotide Exchange Factor Grpe Bound To The Atpase Domain Of The Molecular Chape □ Check to include this hit in error tolerant search Query Observed Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Expect Rank Peptide □ 1 751.00 1499.99 1499.76 0.22 0 56 0.012 1 K.IIAADNGDAWYEVK.G Proteins matching the same set of peptides: dil24111453 Mass: 69085 Score: 56 Queries matched: 1 chaperone Hsp70; autoregulated heat shock protein [Shigella flexmeri 2a str. 301] dil2525936 Mass: 69072 Score: 56 Queries matched: 1 Chaperone protein dnaK [Escherichia coli CFT073] dil45861838 Mass: 69072 Score: 56 Queries matched: 1 CoG0443: Molseuries (Microbulbifer degradams 2-40] 2. dil54026534 Mass: 29441 Score: 22 Queries matched: 1 putative exidereductase [Nocardia farcinica IFM 10152] □ Check to include this hit in error tolerant search 3. dil51012663 Mass: 48617 Score: 18 Queries matched: 1 v3R136C [Saccharomyces cerevisiae] □ Check to include this hit in error tolerant search 3. dil51012663 Mass: 48617 Score: 18 Queries matched: 1 v3R136C [Saccharomyces cerevisiae] □ Check to include this hit in error tolerant search	http://www.matri Peptide Summary	xscience.com/cgi/master_results.pl?file=./data/20050518/FetuOiHE.dat 18.05.200 PReport (E:\Nicola\ETR1\Vormizeele_ETR1_In Lösungsverdau_NETR1_Vormizeele_750.wiff (sample number 1)) Seite 2 von
Select All Select None Search Selected From tolerant 1. gli2392283 Mass: 41500 Score: 56 Queries matched: 1 chan D, Crystal Structure of The Nucleotide Exchange Factor Grpe Bound To The Atpase Domain Of The Molecular Chape Check to include this hit in error tolerant search Query Observed Kr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Expect Rank Peptide 1 751.00 1499.99 1499.76 0.22 0 56 0.012 1 K.ITAADNGDAWVEVR.G Proteins matching the same set of peptides: gli2d111653 Mass: 60075 Score: 56 Queries matched: 1 chaperone Hsp70; autoregulated heat shock protein [Shigella flaxmeri 2a str. 301] gli26245936 Mass: 60072 Score: 56 Queries matched: 1 C00493: Molecular chaperone (Microbulbifer degreans 2-401 C00493: Molecular chaperone (Microbulbifer degreans 2-401 C00493: Molecular chaperone (Microbulbifer degreans 2-401 2. gli5402663 Mass: 29441 Score: 22 Queries matched: 1 putative oxidoreductase [Nocardia farcinica IFM 10152] Check to include this hit in error tolerant search 3. gli51012663 Mass: 48617 Score: 18 Queries matched: 1 YJR136C [Sa	http://www.matri Peptide Summary S	xxcience.com/cgi/master_results.pl?file=/data/20050518/FetuOiHE.dat 18.05.200 Report (E:\Nicola\ETR1\Vormizeele_ETR1_In Lösungsverdau_NETR1_Vormizeele_750.wiff (sample number 1)) Seite 2 von tandard scoring @ MudPIT scoring C lons score cut-off Show sub-sets
Select Al Select None Search Selected Error tolerant 1. gi12392283 Mass: 41500 Score: 56 Queries matched: 1 Chain D, Crystal Structure of The Nucleotide Exchange Factor Grpe Bound To The Atpase Domain Of The Molecular Chape Check to include this hit in error tolerant search Query Observed Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Expect Rank Peptide Proteins matching the same set of peptides: 0124114633 Mass: 69085 Score: 56 Queries matching the same set of peptides: 0126245936 Mass: 69072 Score: 56 Queries matching the same set of peptides: 0126245936 Mass: 69072 Score: 56 Queries matched: 1 Chaperone Happrofor Happrofor Untorgruptated heat shock protein [Shiqella flaxmeri 2a str. 301] 01126245936 Mass: 68072 Score: 56 Queries matched: 1 COG0443: Molecular chaperone [Microbulbifer degradams 2-40] 1 2. 0154026634 Mass: 29441 Score: 22 Queries matched: 1 putative oxidoreductase [Nocardia farcinica IPM 10152] Check to include this hit in error tolerant search 3. gi151012663 Mass: 40617 Score: 18 Queries matched: 1 volksec [Saccharomyces cerevisiae] Check to include this hit in error tolerant search 1	http://www.matri Peptide Summary S	xxscience.com/cgi/master_results.pl?file=/data/20050518/FetuOiHE.dat 18.05.200 / Report (E:\Nicola\ETR1\Vormizeele_ETR1_In Lösungsverdau_NETR1_Vormizeele_750.wiff (sample number 1)) Seite 2 von tandard scoring @ MudPIT scoring C lons score cut-off O Show sub-sets C how pop-ups @ Suppress pop-ups C Sort unassigned Decreasing Score Require bold red C
 gi12392283 Mass: 41500 Score: 56 Queries matched: 1 Chain D, Crystal Structure of The Nucleotide Exchange Factor Grpe Bound To The Atpase Domain Of The Molecular Chape Check to include this hit in error tolerant search Query Observed Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Expect Rank Peptide Proteins matching the same set of peptides:	http://www.matri Peptide Summary S	xscience.com/cgi/master_results.pl?file=/data/20050518/FetuOiHE.dat 18.05.200 Report (E:\Nicola\ETR1\Vormizeele_ETR1_In Lösungsverdau_NETR1_Vormizeele_750.wiff (sample number 1)) Seite 2 von tandard scoring MudPIT scoring Ions score cut-off Show sub-sets how pop-ups Sort unassigned Decreasing Score Require bold red
Chain D, Crystal Structure Of The Nucleotide Exchange Factor Grpe Bound To The Atpase Domain Of The Molecular Chape ☐ Check to include this hit in error tolerant search Query Observed Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Expect Rank Peptide [1 751.00 1459.99 1459.76 0.22 0 56 0.012 1 K.ITAADNGDAWVEVK.G Proteins matching the same set of peptides: Gil24111453 Mass: 65085 Score: 56 Queries matched: 1 chaperone Hsp70; autoregulated heat shock protein [Shigella flawneri 2a str. 301] Gil26245336 Mass: 65072 Score: 56 Queries matched: 1 Chaperone protein dnaK [Escherichia coli CrT073] dil5851838 Mass: 63262 Score: 56 Queries matched: 1 COG0443: Molecular chaperone (Microbulbifer degradans 2-40] 2. gil54026634 Mass: 29441 Score: 22 Queries matched: 1 putative exidereductase [Nocardia farcinica IFN 10152] ☐ Check to include this hit in error tolerant search 9 uery observed Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Expect Rank Peptide 1 751.00 1499.99 1500.78 -0.79 0 22 30 2 R.LLANPGGLTVCDTR.A 3. <u>dil51012663</u> Mass: 40617 Score: 18 Queries matched: 1 yJR136C [Saccharomyces cerevisiae] ☐ Check to include this hit in error tolerant search	http://www.matri Peptide Summary S Select All	xscience.com/cgi/master_results.pl?file=/data/20050518/FetuOiHE.dat 18.05.200 / Report (E:\Nicola\ETR1\Vormizecle_ETR1_In Lösungsverdau_NETR1_Vormizecle_750.wiff (sample number 1)) Seite 2 von tandard scoring @ MudPIT scoring C lons score cut-off O Show sub-sets C Show sub-sets C how pop-ups @ Suppress pop-ups C Sort unassigned Decreasing Score Require bold red C Select None Search Selected C
☐ Check to include this hit in error tolerant search Query Observed Kr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Expect Rank Peptide □ 1 751.00 1499.99 1499.76 0.22 0 56 0.012 1 K.IIAADNGDAWVEVK.G Proteins matching the same set of peptides: gli24111453 Mass: 69085 Score: 56 Queries matched: 1 chaperone Rsp70; autoregulated heat shock protein [Shigella flaxmeri 2a str. 301] gi126245936 Mass: 69072 Score: 56 Queries matched: 1 Chaperone protein dnaK [Escherichia coli CFT073] gli1846183 Mass: 68262 Score: 56 Queries matched: 1 C000443: Molecular chaperone (Microbulbifer degradans 2-40] 2. gli54026634 Mass: 29441 Score: 22 Queries matched: 1 putative oxidoreductase [Nocardia farcinica IPM 10152] □ Check to include this hit in error tolerant search Query Observed Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Expect Rank Peptide 1 751.00 1499.99 1500.78 -0.79 0 22 30 2 R.LLAWPOGLTVCDTR.A 3. gli151012663 Mass: 48617 Score: 18 Queries matched: 1 YJN136C [Saecharomyces cerevisiae] □ Check to include this hit in error tolerant search	http://www.matri Peptide Summary S S Select All 1, gi [2392	xxscience.com/cgi/master_results.pl?file=/data/20050518/FetuOiHE.dat 18.05.200 / Report (E:\Nicola\ETR1\Vormizecle_ETR1_In Lösungsverdau_NETR1_Vormizecle_750.wiff (sample number 1)) Seite 2 von tandard scoring @ MudPIT scoring C lons score cut-off @ Show sub-sets [Show sub-sets [how pop-ups @ Suppress pop-ups C Sort unassigned [Decreasing Score]] Require bold red [Select None Search Selected [Error tolerant]] Wass: #1500 Score: 56 Queries matched: 1
Query Observed Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Expect Rank Peptide Image: The same set of peptides: gil24111463 Mass: 69085 Score: 56 Queries matched: 1 chaperone Hsp70; autoregulated heat shock protein [Shigella flexneri 2a str. 301] gil26245936 Mass: 69072 Score: 56 Queries matched: 1 Chaperone protein dnak [Escherichia coli CFT073] gil4861838 Mass: 62622 Score: 56 Queries matched: 1 COG0443: Molecular chaperone [Microbulbifer degradams 2-40] Cocoetaats Nass: 69441 Score: 22 Queries matched: 1 putative oxidoreductase [Nocardia farcinica IFM 10152] Check to include this hit in error tolerant search 1 751.00 1499.99 1500.78 -0.79 0 22 30 2 R.LLAWPGGLTVCDTR.A 3. gil51012663 Mass: 48617 Score: 18 Queries matched: 1 1 131336C [Saccharomyces cerevisiae] Check to include this hit in error tolerant search 1 1 131336C [Saccharomyces cerevisiae] Check to include this hit in error tolerant search 1 1 131336C [Saccharomyces cerevisiae] Check to include this hit in error tolerant search 1	http://www.matri Peptide Summary S Select All 1. gi 2392 Chain D	xxcience.com/cgi/master_results.pl?file=./data/20050518/FetuOiHE.dat 18.05.200 Report (E:\Nicola\ETR1\Vormizeele_ETR1_In Lösungsverdau_I\ETR1_Vormizeele_750.wiff (sample number 1)) Seite 2 von tandard scoring @ MudPIT scoring C Ions score cut-off @ Show sub-sets how pop-ups @ Suppress pop-ups C Sort unassigned Decreasing Score Select None Search Selected Error tolerant Mass: 41500 Score: 56 Queries matched: 1 , Crystal Structure of The Nocleoride Exchange Factor Grpe Bound To The Atpase Domain Of The Molecular Chape
Query Observed Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Expect Rank Peptide ♥ 1 751.00 1499.99 1499.76 0.22 0 56 0.012 1 K.ITAADNGDAWVEVK.G Proteins matching the same set of peptides: gil24111463 Mass: 5905 Score: 56 Queries matched: 1 chaperone Hsp70; autoregulated heat shock protein [Shigella flexmeri 2a str. 301] gil26245936 Mass: 69072 Score: 56 Queries matched: 1 Chaperone protein dnaK [Escherichia coli CFT073] gil49561838 Mass: 68262 Score: 56 Queries matched: 1 C060443: Molecular chaperone (Microbulbifer degradanis 2-40] 1 10152] 1 C Geod43: Molecular chaperone (Microbulbifer degradanis 2-40] 1 2. gil54026634 Mass: 29441 Score: 22 Queries matched: 1 putative oxidoreductase [Nocardia farcinica IFM 10152] □ Check to include this hit in error tolerant search Query Observed Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Expect Rank Peptide 1 1 751.00 1499.99 1500.78 -0.79 0 22 30 2 R.LAWPGGLTVCDTR.A 3. gil151012663 Mass:	http://www.matri Peptide Summary S Select All 1. gi12392 Chain D Check t	xxcience.com/cgi/master_results.pl?file=./data/20050518/FetuOiHE.dat 18.05.200 Report (E:\Nicola\ETR1\Vormizeele_ETR1_In Lösungsverdau_NETR1_Vormizeele_750.wiff (sample number 1)) Seite 2 von tandard scoring @ MudPIT scoring C Ions score cut-off @ Show sub-sets C how pop-ups @ Suppress pop-ups C Sort unassigned Decreasing Score P Require bold red C Select None Search Selected C Error tolerant C3 Mass: 41500 Score: 56 Queries matched: 1 , Crystal Structure Of The Nucleotide Exchange Factor Grpe Bound To The Atpase Domain Of The Molecular Chape b include this hit in error tolerant search
 Proteins matching the same set of peptides: gil24111453 Mass: 69085 Score: 56 Queries matched: 1 chaperone Rsp70; autoregulated heat shock protein [Shigella flexneri 2a str. 301] gil26243936 Mass: 69072 Score: 56 Queries matched: 1 Chaperone protein dnak [Escherichia coli CFT073] gil48651838 Mass: 68262 Score: 56 Queries matched: 1 CCG0443: Molecular chaperone (Microbulbifer degradams 2-40] 2. gil54026634 Mass: 29441 Score: 22 Queries matched: 1 putative exidereductase [Nocardia farcinica IFM 10152] Check to include this hit in error tolerant search Query Observed Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Expect Rank Peptide 1 751.00 1499.99 1500.78 -0.79 0 22 30 2 R.LLANPGGLTVCDTR.A 3. gil51012663 Mass: 48617 Score: 18 Queries matched: 1 ryR136C [Saccharomyces cerevisiae] Check to include this hit in error tolerant search 	http://www.matri Peptide Summary S Select All 1. <u>gi 2392</u> Chain D Check t	xxscience.com/cgi/master_results.pl?file=./data/20050518/FetuOiHE.dat 18.05.200 r Report (E:\Nicola\ETR1\Vormizecle_ETR1_In Lösungsverdau_NETR1_Vormizecle_750.wiff (sample number 1)) Seite 2 von tandard scoring @ MudPIT scoring © Ions score cut-off @
Proteins matching the same set of peptides: gil24111463 Mass: 69085 Score: 56 Queries matched: 1 chaperone Hsp70; autoregulated heat shock protein [Shigella flexmeri 2a str. 301] gil26245936 Mass: 69072 Score: 56 Queries matched: 1 Chaperone protein dnaK [Escherichia coli CFT073] gil48661838 Mass: 68262 Score: 56 Queries matched: 1 COG0443: Molecular chaperone [Microbulbifer degradams 2-40] 2. gil54026634 Mass: 29441 Score: 22 Queries matched: 1 putative exidereductase [Nocardia farcinica IFM 10152] □ Check to include this hit in error tolerant search Query Observed Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Expect Rank Peptide 1 751.00 1499.99 1500.78 -0.79 0 22 30 2 R.LLAWPGGLTVCDTR.A 3. gil51012663 Mass: 48617 Score: 18 Queries matched: 1 yuRl36C [Saccharomyces cerevisiae] □ Check to include this hit in error tolerant search	http://www.matri Peptide Summary S Select All 1. gi 2392 Chain D Check t Query (xxscience.com/cgi/master_results.pl?file=./data/20050518/FetuOiHE.dat 18.05.200 r Report (E:\Nicola\ETR1\Vormizecle_ETR1_In Lösungsverdau_NETR1_Vormizecle_750.wiff (sample number 1)) Seite 2 von tandard scoring @ MudPIT scoring C Ions score cut-off @
Proteins matching the same set of peptides: g1124111463 Mass: 69085 Score: 56 Queries matched: 1 chaperone Hsp707 autoregulated heat shock protein [Shigella flexneri 2a str. 301] g1126245936 Mass: 69072 Score: 56 Queries matched: 1 Chaperone protein dnaK [Escherichia coli CFT073] g1148661838 Mass: 68262 Score: 56 Queries matched: 1 COG0443: Molecular chaperone [Microbulbifer degradams 2-40] 2. g1154026634 Mass: 29441 Score: 22 Queries matched: 1 putative exidereductase [Nocardia farcinica IFM 10152] □ Check to include this hit in error tolerant search Query Observed Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Expect Rank Peptide 1 751.00 1499.99 1500.78 -0.79 0 22 30 2 R.LLAWPGGLTVCDTR.A 3. g1151012663 Mass: 48617 Score: 18 Queries matched: 1 YJR136C [Saccharomyces cerevisiae] □ Check to include this hit in error tolerant search	http://www.matri Peptide Summary S Select All 1. <u>gi 2392</u> Chain D Check t Query (7 1	xxscience.com/cgi/master_results.pl?file=./data/20050518/FetuOiHE.dat 18.05.200 r Report (E:\Nicola\ETR1\Vormizecle_ETR1_In Lösungsverdau_NETR1_Vormizecle_750.wiff (sample number 1)) Seite 2 von tandard scoring @ MudPIT scoring C Ions score cut-off @
<pre>g112411145.3 Mass: 69085 Score: 36 Queries matched: 1 chaperone Hsp70; autoregulated heat shock protein [Shigella flexneri 2a str. 301] g1126245936 Mass: 69072 Score: 56 Queries matched: 1 Chaperone protein dnaK [Escherichia coli CFT073] g1148651838 Mass: 68262 Score: 56 Queries matched: 1 COG0443: Molecular chaperone [Microbulbifer degradams 2-40] 2. g1154026634 Mass: 29441 Score: 22 Queries matched: 1 putative oxidoreductase [Nocardia farcinica IFM 10152]</pre>	http://www.matri Peptide Summary S Select All 1. gi 2392 Chain D Check t Query C Y 1	xxscience.com/cgi/master_results.pl?file=./data/20050518/FetuOiHE.dat 18.05.200 r Report (E:\Nicola\ETR1\Vormizeele_ETR1_In Lösungsverdau_I\ETR1_Vormizeele_750.wiff (sample number 1)) Seite 2 von tandard scoring @ MudPIT scoring C lons score cut-off @
<pre>displaying metric metric and prove prove and prove</pre>	http://www.matri Peptide Summary S Select All 1. gi 2392 Chain D Check t Query G 1 Protein	xxscience.com/cgi/master_results.pl?file=/data/20050518/FetuOiHE.dat 18.05.200 r Report (E:\Nicola\ETR1\Vormizeele_ETR1_In Lösungsverdau_I\ETR1_Vormizeele_750.wiff (sample number 1)) Seite 2 von tandard scoring @ MudPIT scoring C Ions score cut-off @
Chaperone protein dnaK [Escherichia coli CFT073] gi148861838 Mass: 68262 Score: 56 Queries matched: 1 COG0443: Molacular chaperone [Microbulbifer degradans 2-40] 2. gi154026634 Mass: 29441 Score: 22 Queries matched: 1 putative oxidoreductase [Nocardia farcinica IFM 10152] Check to include this hit in error tolerant search Query Observed Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Expect Rank Peptide 1 751.00 1499.99 1500.78 -0.79 0 22 30 2 R.LLAWPGGLTVCDTR.A 3. gi151012663 Mass: 48617 Score: 18 Queries matched: 1 xJR136C [Saccharomyces cerevisiae] Check to include this hit in error tolerant search	http://www.matri Peptide Summary S Select All 1. gi12392 Chain D Check t Query G 7 1 Protein gi12411	xxscience.com/cgi/master_results.pl?file=./data/20050518/FetuOiHE.dat 18.05.200 r Report (E:\Nicola\ETR1\Vormizeele_ETR1_In Lösungsverdau_NETR1_Vormizeele_750.wiff (sample number 1)) Seite 2 von tandard scoring @ MudPIT scoring C Ions score cut-off @ Show sub-sets [how pop-ups @ Suppress pop-ups C Sort unassigned Decreasing Score] Require bold red [Select None Search Selected [Error tolerant [] Crystal Structure Of The Nucleotide Exchange Factor Grpe Bound To The Atpase Domain Of The Molecular Chape b include this hit in error tolerant search ************************************
<pre>gil48651838 Mass: 68262 Score: 56 Queries matched: 1 CCGG0443: Molacular chaperone (Microbulbifer degradams 2-40] 2. gil54026634 Mass: 29441 Score: 22 Queries matched: 1 putative exidereductase (Nocardia farcinica IFM 10152) □ Check to include this hit in error tolerant search Query Observed Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Expect Rank Peptide 1 751.00 1499.99 1500.78 -0.79 0 22 30 2 R.LLAWPGGLTVCDTR.A 3. gil51012663 Mass: 48617 Score: 18 Queries matched: 1 rJR136C [Saecharomyces cerevisiae] □ Check to include this hit in error tolerant search</pre>	http://www.matri Peptide Summary S Select All 1. gi12392 Chain D Check t Query 0 Protein gi12411 chapero gi12624	xxscience.com/cgi/master_results.pl?file=./data/20050518/FetuOiHE.dat 18.05.200 r Report (E:\Nicola\ETR1\Vormizeele_ETR1_In Lösungsverdau_NETR1_Vormizeele_750.wiff (sample number 1)) Seite 2 von tandard scoring @ MudPIT scoring C Ions score cut-off @
COG0443: Molecular chaperone [Microbulbifer degradans 2-40] 2. gi[54026634 Mass: 29441 Score: 22 Queries matched: 1 putative oxidoreductase [Nocardia farcinica IFM 10152] Check to include this hit in error tolerant search Query Observed Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Expect Rank Peptide 1 751.00 1499.99 1500.78 -0.79 0 22 30 2 R.LLAWPGGLTVCDTR.A 3. <u>gi[51012663</u> Mass: 48617 Score: 18 Queries matched: 1 YJR136C [Saccharomyces cerevisiae] Check to include this hit in error tolerant search	http://www.matri Peptide Summary S Select All 1. gi12392 Chain D Check t Query G 1 Protein gi12612 chapero gi12624	xxscience.com/cgi/master_results.pl?file=./data/20050518/FetuOiHE.dat 18.05.200 r Report (E:\Nicola\ETR1\Vormizeele_ETR1_In Lösungsverdau_NETR1_Vormizeele_750.wiff (sample number 1)) Seite 2 von tandard scoring @ MudPIT scoring © Ions score cut-off @
2. gi154026634 Mass: 29441 Score: 22 Queries matched: 1 putative exidereductase [Nocardia farcinica IFM 10152] Check to include this hit in error tolerant search Query Observed Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Expect Rank Peptide 1 751.00 1499.99 1500.78 -0.79 0 22 30 2 R.LLAWPGGLTVCDTR.A 3. <u>gi151012663</u> Mass: 48617 Score: 18 Queries matched: 1 yJR136C [Saccharomyces cerevisiae] Check to include this hit in error tolerant search	http://www.matri Peptide Summary S Select All 1. gi 2392 Chain D Check t Query (7 1 Protein gi 2411 chapero gi 2624 Chapero gi 2686	xxxcience.com/cgi/master_results.pl?file=./data/20050518/FetuOiHE.dat 18.05.200 r Report (E:\Nicola\ETR1\Vormizecle_ETR1_In Lösungsverdau_NETR1_Vormizecle_750.wiff (sample number 1)) Seite 2 von tandard scoring @ MudPIT scoring C Ions score cut-off @
putative oxidoreductase [Nocardia farcinica IFM 10152] Check to include this hit in error tolerant search Query Observed Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Expect Rank Peptide 1 751.00 1499.99 1500.78 -0.79 0 22 30 2 R.LLAWPGGLTVCDTR.A 3. <u>qii51012663</u> Mass: 48617 Score: 18 Queries matched: 1 yJR136C [Saccharomyces cerevisiae] Check to include this hit in error tolerant search	http://www.matri Peptide Summary S Select All 1. gi 2392 Chain D Check t Query G I Protein dj 2411 chapero gj 2624 Chapero gj 2624 Chapero gj 2624 Chapero gj 2624	xxxcience.com/cgi/master_results.pl?file=./data/20050518/FetuOiHE.dat 18.05.200 r Report (E:\Nicola\ETR1\Vormizeele_ETR1_In Lösungsverdau_I\ETR1_Vormizeele_750.wiff (sample number 1)) Seite 2 von tandard scoring @ MudPIT scoring C lons score cut-off @ Show sub-sets [how pop-ups @ Suppress pop-ups C Sort unassigned Decreasing Score rest Require bold red [Select None Search Selected [Error tolerant 283 Mass: 41500 Score: 56 Queries matched: 1 . Crystal Structure of The Nucleotide Exchange Factor Grpe Bound To The Atpase Domain Of The Molecular Chape include this hit in error tolerant search Weserved Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Expect Rank Peptide 751.00 1499.99 1499.76 0.22 0 56 0.012 1 K.IIAADNGDAWVEVK.G smatching the same set of peptides: 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 301 3
☐ Check to include this hit in error tolerant search Query Observed Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Expect Rank Peptide 1 751.00 1499.99 1500.78 -0.79 0 22 30 2 R.LLAWPGGLTVCDTR.A 3. dil51012663 Mass: 48617 Score: 18 Queries matched: 1 YJR136C [Saccharomyces cerevisiae] □ Check to include this hit in error tolerant search	http://www.matri Peptide Summary S Select All 1. gi 2392 Chain D Check t Query G [7] 1 Protein di 2411 chapero gi12624 Chapero gi12624 Chapero gi12624 Chapero gi12624 Chapero gi12624 Chapero	xxxcience.com/cgi/master_results.pl?file=./data/20050518/FetuOiHE.dat 18.05.200 r Report (E:\Nicola\ETR1\Vormizeele_ETR1_In Lösungsverdau_I\ETR1_Vormizeele_750.wiff (sample number 1)) Seite 2 von tandard scoring @ MudPIT scoring C Ions score cut-off @
Query Observed Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Expect Rank Peptide 1 751.00 1499.99 1500.78 -0.79 0 22 30 2 R.LLAWPGGLTVCDTR.A 3. gii51012663 Mass: 48617 Score: 18 Queries matched: 1 yJR136C [Saccharomyces cerevisiae]	http://www.matri Peptide Summary S Select All 1. gi12392 Chain D Check t Query G V 1 Protein gi12411 chapero gi12624 Chapero gi12624 Chapero gi12624 2. gi15402 putativ	xxxcience.com/cgi/master_results.pl?file=./data/20050518/FetuOiHE.dat 18.05.200 r Report (E:\Nicola\ETR1\Vormizeele_ETR1_In Lösungsverdau_NETR1_Vormizeele_750.wiff (sample number 1)) Seite 2 von tandard scoring @ MudPIT scoring C Ions score cut-off @
1 751.00 1499.99 1500.78 -0.79 0 22 30 2 R.LLAWPGGLTVCDTR.A 3. gii51012663 Mass: 48617 Score: 18 Queries matched: 1 yJR136C [Saccharomyces cerevisiae]	http://www.matri Peptide Summary S Select All 1. gi 2392 Chain D Check t Query C 7 1 Protein gi 2414 Chapero gi 4866 ccoc0443 2. gi 5402 putativ	xxxcience.com/cgi/master_results.pl?file=./data/20050518/FetuOiHE.dat 18.05.200 r Report (E:\Nicola\ETR1\Vormizeele_ETR1_In Lösungsverdau_NETR1_Vormizeele_750.wiff (sample number 1)) Seite 2 von tandard scoring @ MudPIT scoring C Ions score cut-off @ Show sub-sets [how pop-ups @ Suppress pop-ups C Sort unassigned Decreasing Score P Require bold red [Select None Search Selected [Error tolerant 123 Mass: 41500 Score: 56 Queries matched: 1 . Crystal Structure Of The Nucleotide Exchange Factor Grpe Bound To The Atpase Domain Of The Molecular Chape include this hit in error tolerant search Wbserved Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Expect Rank Peptide . 751.00 1499.96 0.22 0 56 0.012 1 K.ITAADNGDAWVEVR.G s matching the same set of peptides: 1453 Mass: 69072 Score: 56 Queries matched: 1 1 ne Hsp70; autoregulated heat shock protein [Shigella flexneri 2a str. 301] 536 Mass: 68262 Score: 56 Queries matched: 1 1838 Mass: 68262 Score: 56 Queries matched: 1 1 1838 Mass: 68262 Score: 56 Queries matched: 1 1 1838 Mass: 68262 Score: 56 <
3. <u>gil51012663</u> Mass: 48617 Score: 18 Queries matched: 1 YJR136C [Saccharomyces cerevisiae] ☐ Check to include this hit in error tolerant search	http://www.matri Peptide Summary S Select All 1. gil2392 Chain D Check t Query 1 Protein gil2411 chapero gil2624 Chapero gil264 Chapero gil264 Chapero gil264 Chapero gil264 Chapero gil264 Chapero gil264 Chapero gil264 Chapero gil264 Chapero gil264 Chapero gil264 Chapero gil264 Chapero	xxxcience.com/cgi/master_results.pl?file=/data/20050518/FetuOiHE.dat 18.05.200 r Report (E:\Nicola\ETR1\Wormizeele_ETR1_In Lösungsverdau_NETR1_Vormizeele_750.wiff (sample number 1)) Seite 2 von tandard scoring @ MudPIT scoring C Ions score cut-off @
3. <u>gil51012663</u> Mass: 48617 Score: 18 Queries matched: 1 xJR136C [Saccharomyces cerevisiae] ☐ Check to include this hit in error tolerant search	http://www.matri Peptide Summary S Select All 1. gi 2392 Chain D Check t Query C I Protein gi 2411 chapero gi 2624 Chapero gi 2624 Chapero gi 2624 Chapero gi 2624 Chapero gi 2624 Chapero gi 2624 Chapero gi 2624 Chapero gi 2622 Chain D Check t Query 1 Check t Query 1 Check t Query 1 Check t	xxxcience.com/cgi/master_results.pl?file=/data/20050518/FetuOiHE.dat 18.05.200 rReport (E:\Nicola\ETR1\Wormizeele_ETR1_In Lösungsverdau_INETR1_Vormizeele_750.wiff (sample number 1)) Seite 2 von tandard scoring @ MudPIT scoring C Ions score cut-off @ Show sub-sets [how pop-ups @ Suppress pop-ups C Sort unassigned Decreasing Score @ Require bold red [SelectNone Search Selected [Error tolerant Error tolerant 183 Mass: 41500 Score: 56 Queries matched: 1 0 Crystal Structure of The Nucleotide Exchange Factor Grpe Bound To The Atpase Domain Of The Molecular Chape Include this hit in error tolerant search beserved Mr(expt) Mrc(alc) Delta Miss Score Expect Rank Peptide 751.00 1499.99 1499.76 0.22 0 56 0.012 1 K.ITAADNGDAWVEVK.G sematching the same set of peptides: 163 Mass: 69055 Score: 56 Queries matched: 1 1 1838 Mass: 69072 Score: 56 Queries matched: 1 1 1 1838 Mass: 68262 Score: 56 Queries matched: 1 1 1838 Mass: 68262 Score: 56 Queries matched: 1 1 1838 Mass: 62622 Score: 56 Queries matched:
YJR136C [Saccharomyces cerevisia] □ Check to include this hit in error tolerant search	http://www.matri Peptide Summary S Select All 1. gi[2392 Chain D Check t Query G 1 Protein cil2411 chapero gi[2411 chapero gi[2412 chaine coco443 2. gi[5402 putativ Check t Query G	xxxcience.com/cgi/master_results.pl?file=/data/20050518/FetuOiHE.dat 18.05.200 v Report (E:\Nicola\ETR1\Vormizecle_ETR1_In Lösungsverdau_NETR1_Vormizecle_750.wiff (sample number 1)) Seite 2 von tandard scoring @ MudPIT scoring @ Ions score cut-off @
Check to include this hit in error tolerant search	http://www.matri Peptide Summary S Select All 1. gi 2392 Check t Query G F 1 Protein chapero gi 2624 Chapero gi 2624 Chapero g	xxxcience.com/cgi/master_results.pl?file=/data/20050518/FetuOiHE.dat 18.05.200 v Report (E:\Nicola\ETR1\Vormizecle_ETR1_In Lösungsverdau_NETR1_Vormizecle_750.wiff (sample number 1)) Seite 2 von tandard scoring @ MudPIT scoring C Ions score cut-off Show sub-sets how pop-ups @ Suppress pop-ups C Sort unassigned Decreasing Score Require bold red Select None Search Selected Error tolerant 123 Mass: 41500 Score: 56 Queries matched: 1 . Cryatal Structure Of The Nucleotide Exchange Factor Grpe Bound To The Atpase Domain Of The Molecular Chape include this hit in error tolerant search kbserved Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Expect Rank Peptide 153: Mass: 60085 Score: 56 Queries matched: 1 ne protein dnaK (Escherichia coli (CrY073)] Ress: 60262 Score: 56 Queries matched: 1 1838 Mass: 29441 Score: 22 Queries matched: 1 1838 Mass: 29441 Score: 22 Queries matched: 1 coiledue this hit in error tolerant search 1 beserved Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Expect Rank Peptide 1138 Mass: 29441 Score: 56 Queries matched: 1 coildorductase [Nocardi
	http://www.matri Peptide Summary S Select All 1. gi12392 Chain D Check t Query G Y 1 Protein gi12411 chapero gi12624 Chapero g	Xxxcience.com/ogi/master_results.pl?file=./data/20050518/FetuOHHE.dat 18.05.200 / Report (E:\Nicola\ETR1\Vormizeele_ETR1_In Lösungsverdau_NETR1_Vormizeele_750.wiff (sample number 1)) Seite 2 von tandard scoring @ MudPIT scoring @ Ions score cut-off @
	http://www.matri Peptide Summary S Select All 1. gi12392 Check t Query G 7 1 Protein gi12411 Chapero gi12624 Chapero gi12624 Chapero gi14886 Coco443 2. gi15402 putativ Check t Query f 1 3. gi15101 yJR1360 Check t	xxxcience.com/ogi/master_results.pl?file=./data/20050518/FetuOHHE.dat 18.05.200 v Report (E:\Nicola\ETR1\Vormizeele_ETR1_In Lösungsverdau_NETR1_Vormizeele_750.wiff (sample number 1)) Seite 2 von tandard scoring @ MudPIT scoring C Ions score cut-off @
	http://www.matri Peptide Summary S Select All 1. gil2392 Chain D Check t Query 0 Protein gil2411 chapero gil2624 Chapero gil2624 Chapero gil2624 Chapero gil2624 Chapero gil2624 Chapero gil4896 COGO443 2. gil5101 yJR136C Check t	xxscience.com/ogi/master_results.pi?file=/data/20050518/FetuOiHE.dat 18.05.200 v Report (E:\Nicola\ETR1\Vormizecle_ETR1_In Lösungsverdau_NETR1_Vormizecle_750.wiff (sample number 1)) Seite 2 von tandard scoring @ MudPIT scoring @ Ions score cut-off @
	http://www.matri Peptide Summary S Select All 1. gi12392 Chain D Check t Query 0 Protein gi12624 Chapero gi126	xxscience.com/ogi/master_results.pi?file=/data/20050518/FetuOiHE.dat 18.05.200 * Report (E:\Nicola\ETR1\Vormizecle_ETR1_In Lösungsverdau_NETR1_Vormizecle_750.wiff (sample number 1)) Seite 2 von tandard scoring @ MudPIT scoring C Ions score cut-off @ Show sub-sets [Show sub-sets [how pop-ups @ Suppress pop-ups C Sort unassigned Decreasing Score I Require bold red [SelectNone SelectNone Search Selected [Error tolerant 223 Mass: 41500 Score: 56 Queries matched: 1 0 Crystal Structure Of The Nucleotide Exchange Factor Grpe Bound To The Atpase Domain Of The Molecular Chape include this hit in error tolerant search bbserved Hr(expt) Hr(calc) Delta Miss Score Expect Rank Paptide 751.00 1499.76 0.22 0 56 0.012 1 K.IRADNGDAWVEVK.G smatching the same set of peptides: 1<
	http://www.matri Peptide Summary S Select All 1. gi[2392 Chain D Check t Query G F 1 Protein di[2411 chapero gi[2624 Chapero g	XXXxience.com/cgi/master_results.pl?file=./data/20050518/FetuOHHE.dat 18.05.200 PReport (E:\Nicola\ETR1\Vormizecle_ETR1 In Lösungsverdau_NETR1_Vormizecle_750.wiff (sample number 1)) Seite 2 von tandard scoring @ MudPPT scoring C Ions score cut-off @

VI.5 Abkürzungen

A. thaliana	Arabidopsis thaliana
AHP	arabidopsis histidine containg phosphoprotein
ARR	arabidopsis response regulator
ATP	Adenosin 5'-Triphosphat
CD	circular dichoism
C-terminal	carboxyterminal
CTR	constitutive triple response
DDM	n-Dodecyl-β-maltosid
DNA	desoxyribonucleine acid
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EIN	ethylene insensitive
ERS	ethylene response sensor
ETR	ethylene resistent
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
IMAC	Immobilisierte Metallchelat Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LOF	loss-of-function
МСР	1-Methylcyclopropen
NEM	N-Ethylmaleimid
N-terminal	aminoterminal
OD	optische Dichte
PCR	polymerase chain reaction
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfat - Polyacrylgelelktrophorese

Danksagung

Hiermit bedanke ich mich bei all denen, die mir während meiner Promotion zur Seite standen und mich mit Rat und Tat unterstützten. Besonders erwähnen möchte ich:

Herrn Prof. Dr. G. Groth, für die herausfordernde Themenstellung, die engagierte Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit, für seine Offenheit, die ständige Diskussionsbereitschaft, für viele Anregungen und immer neue Impulse zum Thema,

Herrn Prof. Dr. K.-E. Jaeger, der das Koreferat übernahm,

alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Biochemie der Pflanzen für die angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die Bereitschaft zur Diskussion, insbesondere Silke Allekotte, Jennifer Andexer, Claudia Büchner, Maria Graf, Thomas Graßes, Nicole Körtgen, Erik Meiß, Claudia Schnick und Antje Wehner,

Silke Allekotte, Anne Kathrin Voet van Vormizeele, Ellen Wannagat für die Durchsicht der Arbeit,

meine Freunde für ihr Interesse und ihre moralische Unterstützung.

Ganz besonders danken möchte ich Nicole Körtgen, die mich mit all ihren Kräften unterstützt und nie aufgehört hat mich zu ermutigen, meiner Familie und schließlich meinen Eltern, die durch ihre immer präsente Unterstützung in allen Lebenslagen während meiner gesamten Studien- und Promotionszeit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Für den gläubigen Menschen steht Gott am Anfang, für den Wissenschaftler am Ende aller seiner Überlegungen. MAX PLANCK