



HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

**Charakterisierung der Signalprozesse von
Typ-II Ethylenrezeptoren aus *Arabidopsis thaliana***

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Mareike Berleth

aus Wuppertal

Düsseldorf, Juli 2018

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

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

Referent: Univ. Prof. Dr. Georg Groth

Korreferent: Univ. Prof. Dr. Michael Bott

Tag der mündlichen Prüfung: 27.09.2019

Für meine Familie

Mama, Papa,

Till, Lena, Jan & Imke

Für meinen Ehemann

Niklas

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Zusammenfassung | 1 |
| Summary | 2 |
| 1 Einleitung | 3 |
| 1.1 Phytohormone - ein komplexes Netzwerk..... | 3 |
| 1.2 Das gasförmige Pflanzenhormon Ethylen | 4 |
| 1.3 Biosynthese des Ethylens und der Yang-Zyklus | 5 |
| 1.4 Signaltransduktion von Ethylen in <i>A. thaliana</i> | 7 |
| 1.4.1 Ethylenwahrnehmung | 7 |
| 1.4.2 Signalweiterleitung..... | 10 |
| 1.5 Der Typ-II Ethylenrezeptor ETR2 aus <i>A. thaliana</i> | 12 |
| 1.6 <i>Microscale</i> Thermophorese..... | 13 |
| 1.7 <i>Fluorescein arsenical hairpin binder</i> (FAsH) | 13 |
| 1.8 Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen anhand der Fluoreszenzlebenszeit und Anisotropie | 15 |
| 1.9 Zielsetzung der Arbeit | 17 |
| 2 Material und Methoden..... | 18 |
| 2.1 Material | 18 |
| 2.1.1 Geräte | 18 |
| 2.1.2 Chromatographie- und Verbrauchsmaterialien | 19 |
| 2.1.3 Chemikalien | 20 |
| 2.1.4 Antikörper..... | 20 |
| 2.1.5 Kommerzielle Kits | 21 |
| 2.1.6 Bakterienstämme | 21 |
| 2.1.7 Vektoren | 22 |
| 2.1.8 Rekombinante Plasmide zur Klonierung und Expression in <i>E. coli</i> | 23 |
| 2.1.9 Rekombinante Plasmide zur Expression in <i>N. benthamiana</i> | 24 |

| | | |
|-------|--|----|
| 2.2 | Molekularbiologische Methoden | 26 |
| 2.2.1 | Bestimmung der Nukleinsäuren-Konzentration..... | 26 |
| 2.2.2 | Isolation von Plasmid-DNA | 26 |
| 2.2.3 | Klonierung und gerichtete Mutagenese..... | 26 |
| 2.3 | Mikrobiologische Methoden | 31 |
| 2.3.1 | Nährmedien zur Anzucht von Bakterienzellen..... | 31 |
| 2.3.2 | Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen durch Hitzeschock..... | 31 |
| 2.3.3 | Transformation kompetenter <i>A. tumefaciens</i> -Zellen über Elektroporation..... | 32 |
| 2.3.4 | Agrobakterien vermittelte Transformation in <i>N. benthamiana</i> -Blättern..... | 33 |
| 2.4 | Heterologe Expression der rekombinanten Proteine in <i>E. coli</i> | 34 |
| 2.4.1 | Expression des Volllängenproteins ETR1 und ETR1-Mutanten..... | 34 |
| 2.4.2 | Expression des Volllängenproteins ETR2..... | 35 |
| 2.4.3 | Expression von ETR1-TM | 35 |
| 2.4.4 | Expression von EIN2-CEND | 35 |
| 2.4.5 | Expression von CTR1..... | 36 |
| 2.5 | Proteinpräparation rekombinanter Proteine aus <i>E. coli</i> | 36 |
| 2.5.1 | Zellaufschluss..... | 36 |
| 2.5.2 | Membranpräparation der in <i>E. coli</i> exprimierten Rezeptoren..... | 37 |
| 2.5.3 | Reinigung der in <i>E. coli</i> exprimierten Rezeptoren..... | 37 |
| 2.5.4 | Reinigung von EIN2-CEND über IMAC | 38 |
| 2.5.5 | Reinigung von CTR1-CFP über IMAC | 39 |
| 2.6 | Markierung und Reinigung der ETR1_FlAsH-Mutanten..... | 40 |
| 2.7 | Proteinbiochemische Methoden..... | 41 |
| 2.7.1 | Bestimmung der Proteinkonzentration über UV-Absorption bei 280 nm | 41 |
| 2.7.2 | Spektroskopische Bestimmung der Proteinkonzentration und Markierungseffizienz | 42 |
| 2.7.3 | Erhöhung der Proteinkonzentration durch Ultrafiltration..... | 42 |
| 2.7.4 | Wechsel der Pufferlösung mittels PD-Entsalzungssäulen..... | 43 |
| 2.7.5 | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese | 43 |
| 2.7.6 | Färbung der Polyacrylamidgele mit kolloidalem Coomassie | 44 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.7.7 | WesternBlot..... | 45 |
| 2.7.8 | Immunologischer Nachweis | 45 |
| 2.7.9 | Markierung der gereinigten Proteine mit dem Farbstoff Alexa488..... | 46 |
| 2.8 | Proteincharakterisierung..... | 47 |
| 2.8.1 | <i>In vitro</i> Kinaseaktivitätstest | 47 |
| 2.8.2 | Cirkulardichroismus-Spektroskopie..... | 48 |
| 2.8.3 | <i>Microscale</i> Thermophorese..... | 50 |
| 2.8.4 | Analyse von ETR1_FlAsH-Mutanten über Fluoreszenzspektroskopie.. | 51 |
| 2.8.5 | Konfokale Fluoreszenzmikroskopie..... | 52 |
| 2.8.6 | <i>Fluorescence Lifetime Imaging</i> Mikroskopie (FLIM)..... | 53 |
| 2.9 | Datenbanken und Computerprogramme | 55 |
| 3 | Ergebnisse | 56 |
| 3.1 | Molekulare Charakterisierung der Ethylenrezeptoren ETR1 und ETR2..... | 58 |
| 3.1.1 | Reinigung des Typ-I Rezeptors ETR1 über IMAC..... | 58 |
| 3.1.2 | Heterologe Expression des Typ-II Rezeptors ETR2..... | 59 |
| 3.1.3 | Reinigung des Typ-II Rezeptors ETR2 über IMAC..... | 61 |
| 3.1.4 | Cirkulardichroismus-Spektroskopie von ETR1 und ETR2 zur Untersuchung der Sekundärstruktur..... | 62 |
| 3.1.5 | <i>In vitro</i> Kinase-Assay zur Analyse der Autophosphorylierungsaktivität..... | 65 |
| 3.2 | Interaktionsanalyse der Rezeptoren mit nachfolgenden Komponenten des Ethylensignalweges..... | 68 |
| 3.2.1 | Reinigung von EIN2-CEND über IMAC | 68 |
| 3.2.2 | Quantifizierung der Rezeptor-EIN2-Interaktion über <i>Microscale</i> Thermophorese | 70 |
| 3.2.3 | EIN2-CEND – Ligandeninteraktion mit Ca ²⁺ | 71 |
| 3.2.4 | Einfluss der EIN2-Ca ²⁺ - Bindung auf die EIN2-Rezeptor- Komplexbildung..... | 72 |
| 3.2.5 | Reinigung von CTR1-CFP über IMAC | 73 |
| 3.2.6 | Quantifizierung der Rezeptor-CTR1-Interaktion über <i>Microscale</i> Thermophorese | 74 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.3 | Markierung des Membranproteins ETR1 mit dem Fluorophor FIAsh | 75 |
| 3.3.1 | Expression der ETR1-Mutanten mit Tetracysteinmotiv | 76 |
| 3.3.2 | Markierung und Reinigung der Mutanten ETR1_FIAsh ⁷⁴⁻⁸⁵ und ETR1_FIAsh ¹²³⁻¹³² über IMAC..... | 78 |
| 3.3.3 | Analyse der spezifischen Markierung der Mutanten ETR1_FIAsh ⁷⁴⁻⁸⁵ und ETR1_FIAsh ¹²³⁻¹³² über Fluoreszenzspektroskopie | 79 |
| 3.3.4 | Funktionelle Charakterisierung der FIAsh-markierten Rezeptoren über die Interaktion mit EIN2..... | 80 |
| 3.4 | <i>In vitro</i> Quantifizierung der homo- und heteromeren Rezeptor-Rezeptor- Interaktionen..... | 81 |
| 3.4.1 | Reinigung der isolierten ETR1-Transmembrandomäne über IMAC..... | 81 |
| 3.4.2 | Quantifizierung der Rezeptor-Rezeptor-Komplexbildung über <i>Microscale</i> Thermophorese..... | 82 |
| 3.4.3 | Einfluss des Phosphorylierungsstatus der Rezeptoren auf die Rezeptor-Rezeptor-Interaktion | 85 |
| 3.5 | <i>In vivo</i> Analyse der homo- und heteromeren Rezeptor-Rezeptor- Interaktionen..... | 86 |
| 3.5.1 | Transiente Expression in <i>N. benthamiana</i> – Analyse der intrazellulären Rezeptor-Lokalisation..... | 86 |
| 3.5.2 | <i>Fluorescence Lifetime Imaging</i> Mikroskopie (FLIM) zur Analyse der Rezeptor-Rezeptor-Interaktion | 90 |
| 4 | Diskussion..... | 96 |
| 4.1 | Molekulare Charakterisierung der Ethylenrezeptoren ETR1 und ETR2..... | 97 |
| 4.1.1 | Heterologe Expression und Reinigung des Typ-II Rezeptors ETR2..... | 97 |
| 4.1.2 | Reinigung des Typ-I Rezeptors ETR1 | 98 |
| 4.1.3 | Untersuchung der Sekundärstrukturanteile der Rezeptoren ETR1 und ETR2 über CD-Spektroskopie..... | 99 |
| 4.1.4 | Analyse der <i>in vitro</i> Autokinaseaktivität von ETR1 und ETR2 | 100 |
| 4.1.5 | Quantifizierung der Rezeptor-EIN2-Interaktion | 101 |
| 4.1.6 | Untersuchung der Ca ²⁺ - EIN2-CEND-Interaktion..... | 103 |
| 4.1.7 | Quantifizierung der Rezeptor-CTR1-Interaktion | 104 |
| 4.2 | Markierung des Membranproteins ETR1 mit dem Fluorophor FIAsh | 105 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 4.3 | <i>In vitro</i> Analyse der Rezeptor-Rezeptor-Komplexbildung..... | 107 |
| 4.3.1 | Quantifizierung der Rezeptor-Rezeptor-Komplexbildung über <i>Microscale</i> Thermophorese..... | 107 |
| 4.3.2 | Einfluss des Phosphorylierungsstatus der Rezeptoren auf die Rezeptor-Rezeptor-Interaktion | 110 |
| 4.4 | Kolokalisation der Ethylenrezeptoren am Endoplasmatischen Retikulum.... | 111 |
| 4.5 | Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen über die Fluoreszenzlebenszeit und Anisotropie | 114 |
| 4.5.1 | Quantifizierung der Fluoreszenzlebenszeit..... | 114 |
| 4.5.2 | Analyse der homo- und heteromeren Interaktionen über Anisotropie | 117 |
| 4.6 | Ausblick..... | 119 |
| 5 | Literatur..... | 120 |
| 6 | Anhang | 131 |
| 6.1 | Abkürzungen | 131 |
| 6.2 | Aminosäuren-Sequenzvergleiche..... | 134 |
| 6.2.1 | AS-Sequenzvergleich von AtETR1 und AtERS1..... | 134 |
| 6.2.2 | AS-Sequenzvergleich von AtETR2 und AtERS2 | 135 |
| 6.2.3 | AS-Sequenzvergleich von AtETR1 und AtETR2..... | 136 |
| 6.3 | Messbedingungen in der <i>Microscale</i> Thermophorese | 137 |
| 6.4 | Oligonukleotide | 142 |
| | Danksagung | 144 |
| | Erklärung | 146 |

Zusammenfassung

Das gasförmige Pflanzenhormon Ethylen ist im pflanzlichen Lebenszyklus an zahlreichen Wachstums- und Entwicklungsprozessen beteiligt. Im Modellorganismus *A. thaliana* erfolgt die Ethylenwahrnehmung durch eine Familie aus fünf Ethylenrezeptoren, die in zwei Unterfamilien eingeteilt werden. Die Typ-I Rezeptoren bestehen aus ETR1 und ERS1, während zu den Typ-II Rezeptoren ETR2, ERS2 und EIN4 zählen. Trotz der agrarökonomisch großen Bedeutung von Ethylen, sind die genauen Mechanismen der Signalweiterleitung und Struktureigenschaften der Typ-II Rezeptoren noch wenig untersucht.

Um einen Einblick in das komplexe Zusammenspiel der Rezeptoren untereinander und mit nachfolgenden Signalkomponenten zu erhalten, erfolgte in dieser Arbeit die Charakterisierung und Quantifizierung von Protein-Protein-Interaktionen ausgehend von den Typ-II Rezeptoren ETR2 und ERS2.

So konnte im Rahmen dieser Arbeit die Funktionalität des isolierten Rezeptors ETR2 über CD-Spektroskopie und Nachweis der Autokinaseaktivität erbracht werden. Die Interaktionen von ETR2 mit ETR1, EIN2 und CTR1 wurden quantifiziert und in direktem Vergleich zu Interaktionen des Typ-I Rezeptors ETR1 dargestellt. Zudem war es möglich den Rezeptor ETR1 spezifisch mit einem biarsenischen Farbstoff (FIAsH) zu markieren und in Bindungsstudien mit EIN2 zu verwenden, wodurch eine Methode zur positionsspezifischen und selektiven Markierung eines Membranproteins etabliert wurde.

Durch *in vitro* Quantifizierung der Rezeptor-Rezeptor-Interaktionen zeigte sich, dass die homomere Typ-II Rezeptor-Interaktion den hetero- und homomeren Interaktionen unter Beteiligung des Typ-I Rezeptors vorgezogen wird. Über *in planta* Studien konnte zudem der Nachweis von homo- und heteromeren Rezeptorinteraktionen für ERS2 als weiteren Vertreter der Typ-II Unterfamilie durch Messungen der FRET-Effizienzen und Anisotropie erbracht werden.

Auch wenn ETR1, als dem Prototyp der Ethylenrezeptoren, eine besondere Stellung in der Signalweiterleitung inneohnt, so konnte die vorliegende Charakterisierung für ETR2 zeigen, dass dieser Typ-II Rezeptor keinesfalls eine untergeordnete Rolle in der Signalweiterleitung einnimmt.

Summary

The gaseous plant hormone ethylene is involved in numerous growth and developmental processes in a plants life cycle. In the model organism *A. thaliana*, ethylene is perceived by a family of five ethylene receptors, which are further divided into two subfamilies. ETR1 and ERS1 are the type I receptors, while ETR2, ERS2 and EIN4 belong to the type II receptor subfamily. Despite its importance for agricultural economy, the exact mechanisms of ethylene signal transduction and structural features of type II receptors are still not fully understood.

In order to gain insights into the receptors complex interactions among each other and with subsequent signaling components, this work characterized and quantified protein-protein interactions mediated by the type II receptors ETR2 and ERS2.

In this work, the functionality of the isolated receptor ETR2 was demonstrated by CD spectroscopy and detection of autokinase activity. The interactions between ETR2 and ETR1, EIN2 and CTR1 were quantified and directly correlated to interactions of the type I receptor ETR1. In addition, a specific labeling of the receptor ETR1 with a biarsenic dye (FIAsH) was performed, thereby establishing a method for site-specific and selective labeling of a membrane protein.

By *in vitro* quantification of receptor-receptor interactions, a preference of homomeric type II receptor interaction over hetero- and homomeric interactions involving the type I receptor was identified. Additional evidence for homo- and heteromeric receptor interactions could be gathered for ERS2 as further member of the type-II subfamily by measurements of FRET efficiencies and anisotropy in *in planta* studies.

Although ETR1, as the prototype of ethylene receptors, possesses an exceptional role in ethylene signal transduction, the here performed characterization of ETR2 has proven that this type II receptor does not play a subordinate role in signal transduction.

1 Einleitung

1.1 Phytohormone - ein komplexes Netzwerk

Pflanzen sind sessile Organismen deren Wachstum und Entwicklung von einer Vielzahl pflanzlicher Hormone gesteuert wird. Pflanzenhormone steuern ein komplexes System der Signalweitergabe, wodurch Pflanzen in der Lage sind, sich durch fein abgestimmte Regulationsmechanismen an ständig wechselnde Umwelteinflüsse anzupassen. Bei den als Pflanzen- oder auch Phytohormonen bezeichneten Substanzen handelt es sich um eine Gruppe kleiner organischer Moleküle, welche bereits in nanomolaren Konzentrationen wirksam sind [1,2]. Diese werden nicht organspezifisch, sondern in der ganzen Pflanze gebildet. Dennoch können diese Hormone nicht nur lokal am Ort ihrer Synthese, sondern systemisch in einer Pflanze wirken, indem sie über das vaskuläre System innerhalb der Pflanze transportiert werden [2,3]. Hierbei wird die Regulation der Pflanzenhormone sowohl von exogenen, als auch endogenen Signalen beeinflusst. Einen endogenen Faktor stellen dabei die Pflanzenhormone selbst dar. Sie bedingen nicht nur komplexe Mechanismen der Signalweiterleitung, sondern sind auch in der Lage sich gegenseitig zu beeinflussen, was allgemein hin als sogenannter *Crosstalk* bezeichnet wird [4].

Strukturell betrachtet stehen die verschiedenen Pflanzenhormone nicht in einem Zusammenhang zueinander [3]. Auxin, Ethylen, Cytokinin, Gibberellin und Abscisinsäure gelten als klassische Vertreter von Pflanzenhormonen, deren Gruppe jedoch durch Brassinosteroide, Jasmonsäure, Salizylsäure, Stringolactone, Stickstoffmonoxid, sowie einige Peptide ergänzt wird [5,6]. Zusammengenommen stehen alle Aspekte eines pflanzlichen Lebenszyklus, von der Embryogenese bis zur Seneszenz, unter der Kontrolle von Pflanzenhormonen, wobei jedes einzelne dieser Hormone eine vielfältige Wirkungsweise besitzt. Oftmals werden dabei physiologische Prozesse nicht nur durch einzelne Hormone gesteuert [1,2,4]. Ein Beispiel hierfür ist die Inhibierung der Wurzelelongation durch Ethylen und Auxin oder die Samenkeimung, welche durch Ethylen initiiert und durch Abscisinsäure inhibiert wird [7,8].

1.2 Das gasförmige Pflanzenhormon Ethylen

Der Einfluss von Ethylen auf Pflanzen wurde bereits im 19. Jahrhundert bei der Entlaubung von Bäumen beobachtet, die in der Nähe von mit Kohlegas betriebenen Straßenlaternen standen [9]. 1901 identifizierte Dimitry Neljubow Ethylen als die aktive Komponente im Kohlegas. In seinen Versuchen mit im Dunkeln herangezogenen Erbsenkeimlingen konnte er den Einfluss des Gases genauer untersuchen [10]. Die dabei auftretenden morphologischen Veränderungen der Keimlinge – radiale Verdickung des Hypokotyls, horizontales Wachstum, sowie Verkürzung des Längenwachstums – wurden später als sogenannte Dreifachantwort (*triple response*) bezeichnet [11]. Ethylen ist vor allem für seine Beteiligung an der Fruchtreifung bekannt. Das Pflanzenhormon ist aber in einer Vielzahl von pflanzlichen Wachstums- und Entwicklungsprozessen involviert. Dabei reguliert Ethylen unter anderem die Samenkeimung, Blütenentwicklung, Blattabszission und andere Seneszenzprozesse [12-16]. Ethylen ist zudem an der Regulation von biotischen und abiotischen Stressreaktionen beteiligt, hierzu gehören beispielsweise Reaktionen bei Trockenstress, Überflutung oder bei Pathogenbefall der Pflanze [17,18].

Der einfachste ungesättigte Kohlenwasserstoff Ethylen (C_2H_4) stellt strukturell ein sehr einfach aufgebautes Pflanzenhormon dar. Es war eins der ersten Pflanzenhormone, die entdeckt wurden und das erste bekannte gasförmige Pflanzenhormon [14,19], als weiteres wurde bisher nur Methyljasmonat identifiziert [20]. Ethylen ist bereits in nanomolaren Konzentrationen wirksam. Es ist ein hydrophobes Molekül, mit einer 14fach höheren Löslichkeit in Lipiden als in Wasser. Es kann in Folge dessen Zellmembranen ungehindert passieren und in benachbarte Zellen diffundieren. Zudem ist seine Diffusionsrate in Luft um den Faktor 10.000 höher als in Wasser. Es ist somit in der Lage auch benachbarte Pflanzen zu erreichen, indem es durch die Luft diffundiert, ohne hierfür ein spezifisches Transportsystem zu benötigen [14,19]. Ethylen stellt damit eine besondere Rolle unter den Pflanzenhormonen dar. Es ist in der Lage sowohl endogen in den Pflanzenzellen zu wirken, da Pflanzen Ethylen in ihren Zellen synthetisieren. Aber auch exogen, wenn Ethylen zwischen verschiedenen Pflanzen diffundiert oder Nutzpflanzen in der Landwirtschaft mit Ethylen oder Agonisten zur Initiation von Reifungsprozessen behandelt werden [21,22]

1.3 Biosynthese des Ethylens und der Yang-Zyklus

Ethylen ist ein einfacher Kohlenwasserstoff, welcher sowohl exogen auf Pflanzen einwirken kann, als auch endogen von der Pflanze gebildet wird. In Abb. 1.1 ist die pflanzliche Synthese von Ethylen und die Regeneration von Methionin im sogenannten Methionin-Weg aufgeführt, welcher später als Yang-Zyklus bekannt wurde.

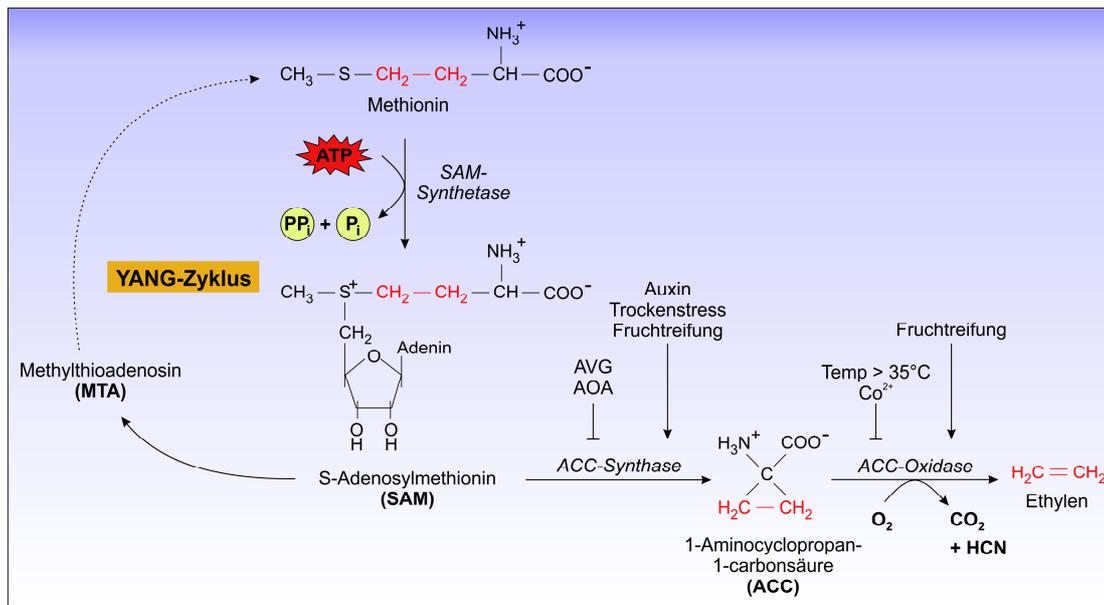


Abb. 1.1.: Ethylenbiosynthese und Regeneration von Methionin im Yang-Zyklus. Ausgehend von der Aminosäure Methionin wird das Pflanzenhormon Ethylen gebildet. S-Adenosylmethionin (SAM) wird durch die SAM-Synthetase aus Methionin synthetisiert und anschließend durch die ACC-Synthase in 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC) umgewandelt. Hierbei entsteht Methylthioadenosin (MTA) als Nebenprodukt, welches über mehrere Intermediate zu Methionin regeneriert wird (Yang-Zyklus). Die ACC-Oxidase katalysiert schließlich die Umwandlung von ACC zu Ethylen. Die Regulation der Ethylenbiosynthese erfolgt durch verschiedene Faktoren, die inhibierend (\perp) bzw. stimulierend (\downarrow) auf die Enzyme ACC-Synthase und ACC-Oxidase wirken. AVG = Aminoethoxyvinylglycin, AOA = Aminoxyessigsäure.

Ethylen wird aus der Aminosäure Methionin gebildet. Zunächst wird Methionin unter ATP-Verbrauch zu S-Adenosylmethionin (SAM) von der SAM-Synthetase aktiviert. Ausgehend von S-Adenosylmethionin wird Ethylen über zwei Reaktionsschritte synthetisiert.

Im ersten Schritt spaltet die 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure-Synthase (ACC-Synthase) die Aminobutyrat-Gruppe von SAM ab. Pyridoxalphosphat dient hierbei als Cofaktor für die

Katalyse. Es entstehen 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC) und als Nebenprodukt Methylthioadenosin (MTA), welches über mehrere Zwischenstufen im Yang-Zyklus zu Methionin regeneriert wird, so dass erneut Methionin zur Ethylenbiosynthese zur Verfügung steht. ACC wird im zweiten Schritt der Biosynthese durch das Enzym ACC-Oxidase zu Ethylen oxidiert, außerdem entstehen Kohlenstoffdioxid und Cyanid als Nebenprodukte [17,23,24]. Cyanid ist für alle lebenden Zellen und folglich auch für Pflanzen giftig [25]. Es führt beispielsweise zur Zellnekrose bei Blättern von *Nicotiana tabacum* [26] oder reduziert das Wachstum von *A. thaliana* [27]. Pflanzen besitzen Mechanismen zur Zellentgiftung. Eine zentrale Rolle spielt hierbei das Enzym β -Cyanoalanin-Synthase, welches an der Katalyse von Cyanid zur Aminosäure Asparagin beteiligt ist [28].

Die Ethylenbiosynthese wird über die Regulation der Enzyme ACC-Synthase und ACC-Oxidase gesteuert. Sowohl die ACC-Synthase, als auch die ACC-Oxidase werden von einer Gruppe von Genen kodiert, die von verschiedenen Induktoren reguliert werden [29,30]. Zu diesen Induktoren zählen biotische Faktoren wie verschiedene Pflanzenhormone. Hierzu gehören beispielweise Auxin, Cytokinin oder die Brassinosteroide, aber auch Ethylen selbst [31-33]. Ethylen hat einen autokatalytischen Effekt auf seine eigene Synthese, so dass bei der Fruchtreifung oder bei Seneszenzprozessen benachbarte Pflanzen die Synthese gegenseitig fördern und die Ethylenproduktion damit stark ansteigt [17]. Aber auch abiotische Induktoren, wie Ozon, Metallionen, wie beispielsweise Cobalt oder Kupfer und mechanische Stimulantien regulieren die Ethylenbiosynthese über die beiden ACC-Enzyme [34-36].

1.4 Signaltransduktion von Ethylen in *A. thaliana*

1.4.1 Ethylenwahrnehmung

Die Signalkaskade des Ethylensignalweges wird durch die Bindung des Pflanzenhormons Ethylen an eine kleine Familie von Rezeptoren ausgelöst. Diese Rezeptorfamilie umfasst je nach Organismus eine unterschiedliche Anzahl an Rezeptoren. In *Lycopersicon esculentum* konnten bislang 7 Rezeptoren identifiziert werden, während die Signalwahrnehmung in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* lediglich über fünf Rezeptoren erfolgt [37–39].

Die Ethylenrezeptoren weisen strukturelle Ähnlichkeiten zu Hybridkinasen bakterieller Zweikomponentensysteme auf und werden anhand phylogenetischer Studien und ihres strukturellen Aufbaus weiterhin in zwei Typen unterteilt. Die Rezeptoren *ethylene resistant 1* (ETR1) und *ethylene response sensor 1* (ERS1) bilden die Gruppe der ETR1-ähnlichen Rezeptoren (Typ-I) während die Rezeptoren ETR2, ERS2 und *ethylene insensitive 4* (EIN4) zur Gruppe der ETR2-ähnlichen Rezeptoren (Typ-II) gezählt werden [40–42]. Alle Rezeptoren zeichnen sich durch einen gemeinsamen modularen Aufbau aus, welcher schematisch in Abb. 1.2 dargestellt ist.

Alle Rezeptoren bestehen aus einer N-terminalen Transmembrandomäne, sowie einem zytosolischen Bereich aus GAF-, und Kinase-Domäne. Drei der Rezeptoren besitzen zusätzlich eine Antwort-Regulator-Domäne. Die N-terminale Transmembrandomäne verankert die Rezeptoren in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) [43]. Auf Grund der hohen Löslichkeit von Ethylen in Lipiden und wässriger Umgebung, ist eine Signalwahrnehmung, trotz dieser für Rezeptoren ungewöhnlichen Lokalisation, möglich [14]. Bei den Typ-I Rezeptoren besteht die Transmembrandomäne aus drei Transmembranhelices, während bei den Typ-II Rezeptoren eine zusätzliche Transmembranhelix vorhanden ist, für welche eine Funktion als Signalsequenz diskutiert wird [44].

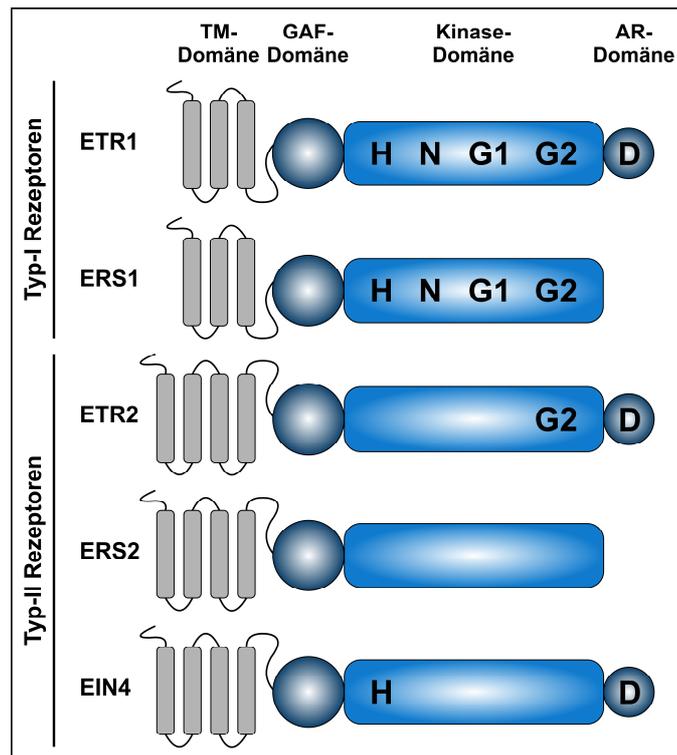


Abb. 1.2.: Schematische Darstellung der Ethylenrezeptorfamilie aus *A. thaliana*. Die fünf in *A. thaliana* vorkommenden Ethylenrezeptoren werden auf Grundlage phylogenetischer Analysen und struktureller Merkmale in die Typ-I und die Typ-II Unterfamilien unterteilt. Die Ethylenrezeptoren sind jeweils als Monomere dargestellt. Die Ethylenbindestelle befindet sich in der Transmembrandomäne, worauf der zytosolische Bereich mit GAF- und Kinase-Domäne folgt. Die Kinase-Domäne ist unter den Typ-I Rezeptoren ETR1 und ERS1 hochkonserviert, während diese bei den Typ-II Rezeptoren ETR2, ERS2 und EIN4 degeneriert vorliegt. Die Antwort-Regulator-Domäne ist nur in den drei Rezeptoren ETR1, ETR2 und EIN4 vorhanden. TM: Transmembran-Domäne, AR: Antwort-Regulator(AR)-Domäne, H: konserviertes Histidin, N-, G1-, G2-Box: ATP-Bindungsmotiv.

Allen Rezeptoren gemein ist die Bildung von über zwei Disulfidbrücken verknüpfte kovalente Dimere, welche die kleinste funktionelle Einheit für die Ethylenbindung darstellen. Die beiden zur Dimerisierung nötigen Cysteine sind in allen Rezeptoren konserviert, ihre genauen Positionen unterscheidet sich jedoch. So können die Monomere von ETR1 über die beiden Cysteine an Position 4 und 6 Dimere ausbilden [45]. Des Weiteren wurde für alle Rezeptoren die Ausbildung von homo- und auch heteromeren Rezeptorkomplexen nachgewiesen, woran eine Beteiligung der GAF (*cGMP-specific phosphodiesterases adenyl cyclases, formate hydrogen lyase transcriptional*

activator) - Domäne gezeigt wurde [46]. Bei sämtlichen Rezeptoren handelt es sich um Autokinasen, wobei allerdings nur die beiden Typ-I Rezeptoren ETR1 und ERS1 alle für Histidinkinasen typischen Merkmalen besitzen. Hier sind sowohl der konservierte Histidinrest, als auch die zur ATP-Bindung notwendigen Sequenzmotive (N-, G1-, G2-Box) vorhanden. Bei den Typ-II fehlen die Sequenzmotive für die ATP-Bindung teilweise vollständig und der konservierte Histidinrest ist auch nur in EIN4 vorhanden. Dennoch wurde für die Rezeptoren der zweiten Unterfamilie ebenfalls eine Autophosphorylierungsaktivität nachgewiesen, wobei für diese jedoch eine Serin/Threonin-Kinaseaktivität vermutet wird [47]. Inwiefern die Kinaseaktivität der Rezeptoren jedoch eine Rolle in der Signalweiterleitung spielt, ist bisher unbekannt. Studien konnten zwar eine Modulation von Protein-Protein-Interaktionen zeigen, aber eine Bedeutung für die Signalweiterleitung konnte bisher nicht geklärt werden [48]. Die für Hybridkinasen typische Antwort-Regulator-Domäne ist nur bei den Rezeptoren ETR1, ETR2 und EIN4 vorhanden. Eine Interaktion konnte zwar mit nachfolgenden Komponenten des Ethylensignalweges nachgewiesen werden, deren Bedeutung ist aber bislang noch unklar [49].

Bisherige Studien konnten zeigen, dass die Rezeptoren unterschiedliche Ethylenantworten regulieren. So steht die Wachstumsregeneration von *A. thaliana* nach Ethylenbehandlung unter der Kontrolle von ETR1, ETR2 und EIN4 oder die Stärkeakkumulation in Reis unter der Kontrolle von ETR2. Die dabei zugrundeliegenden Mechanismen der einzelnen Sub-Typen sind bisher jedoch noch nicht bekannt [48,50,51]

1.4.2 Signalweiterleitung

Die Signalwahrnehmung von Ethylen erfolgt über die, in 1.4.1 bereits beschriebenen, ER-ständigen Ethylenrezeptoren. Diese bilden über Disulfidbrücken verknüpfte Dimere aus, welche in der Lage sind Ethylen zu binden. Für die Ethylenbindung wird weiterhin Kupfer als Kofaktor benötigt, welches von der P-Typ ATPase RAN1 (*response to antagonist 1*) aus dem ER zur Verfügung gestellt wird [52–54]. Über genetische Studien wurde gezeigt, dass sämtliche Rezeptoren als Negativregulatoren wirken [39].

Solang Ethylen nicht in der Zelle vorhanden ist, aktivieren die Rezeptoren die Raf (*rapidly accelerated fibrosarcoma*)-ähnliche Serin-Threonin-Kinase CTR1 über noch unbekannte Mechanismen [15,55]. Bei *constitutive triple response 1* (CTR1) handelt es sich um ein zytosolisches Protein, welches durch Bindung seiner N-terminalen Interaktionsdomäne an die Kinase- und die Antwort-Regulator-Domäne der Ethylenrezeptoren am ER assoziiert ist [56]. CTR1 ist neben den Rezeptoren ein weiterer Negativregulator im Ethylensignalweg. In aktivem Zustand unterbindet CTR1 die weitere Signalweiterleitung durch Phosphorylierung des Positivregulators *ethylene insensitive 2* (EIN2), welches über die beiden F-Box Proteine ETP1/2 (*EIN2 targeting protein*) vermittelt degradiert wird [15,57–59].

Für EIN2 konnte ebenfalls eine Lokalisation am ER gezeigt werden [60]. Der N-Terminus von EIN2 weist Sequenzähnlichkeiten mit Metallionentransportern der Nramp-Familie auf [61], die Rolle dieser Domäne im Ethylensignalweg ist hingegen noch völlig unbekannt. Der C-Terminus von EIN2 hingegen besitzt keine Sequenzhomologien zu bekannten Proteindomänen.

In Gegenwart von Ethylen (vgl. Abb. 1.3) hingegen inaktivieren die Rezeptoren die Kinase CTR1 und verhindern dadurch eine Phosphorylierung und den damit verbundenen Abbau von EIN2. Der unphosphorylierte C-Terminus von EIN2 (EIN2-CEND) wird dann über eine noch unbekannte Protease abgespalten und vom im ER-verankerten N-Terminus getrennt. Bisherige Studien konnten zeigen, dass EIN2-CEND ausreichend ist um eine Ethylenantwort auszulösen [57,61,62].

Die Signaltransduktion von EIN2-CEND erfolgt dabei über verschiedene Mechanismen. Zum einen unterdrückt EIN2-CEND die Translation der EIN3-binding F-Box Proteine 1 und 2

(EBF1/2), indem es an untranslatierte Regionen der *EBF1/2* mRNA bindet und dadurch den Abbau der *EBF1/2* mRNA in sogenannten *processing bodies* (P-bodies) vermittelt [63].

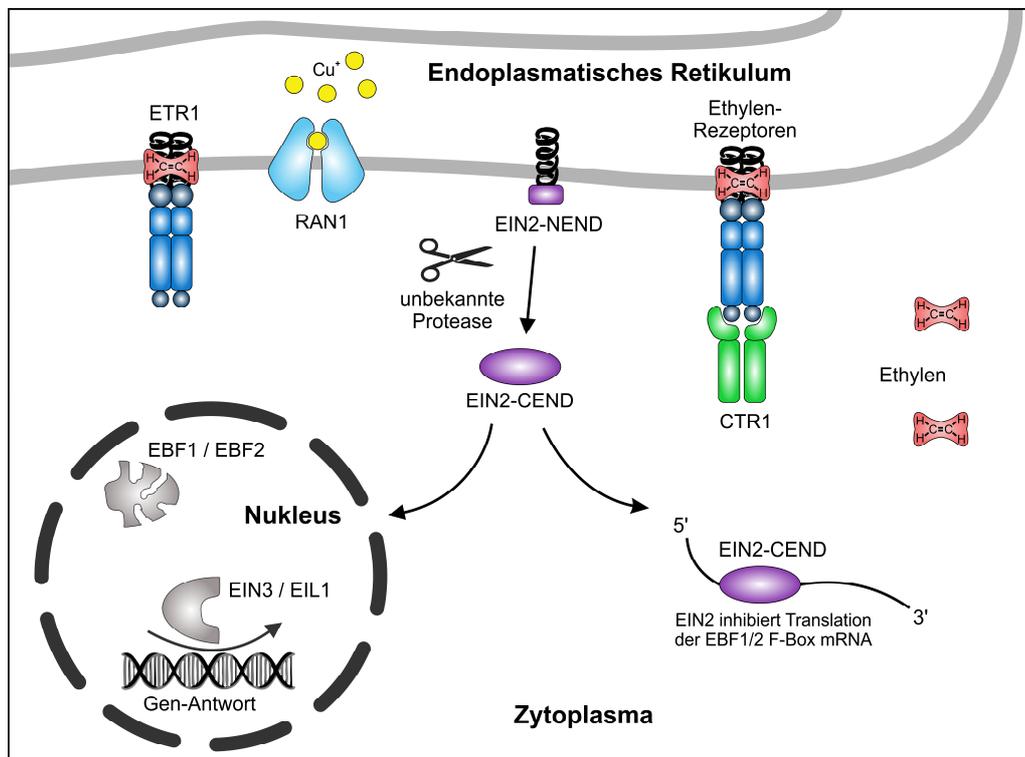


Abb. 1.3.: Schematische Darstellung der Ethylensignaltransduktion. Bindung von Ethylen an seine Rezeptoren führt zur Inaktivierung von CTR1, wodurch eine Phosphorylierung von EIN2 unterdrückt wird. Dies führt zur proteolytischen Spaltung von EIN2-CEND, welcher die Translation der EBF1/2-Box-Proteine inhibiert. Dadurch wird der Abbau der Transkriptionsfaktoren EIN3/EIL1 verhindert, welche die Transkriptionskaskade und somit die Ethylenantwort regulieren. Des Weiteren ist EIN2-CEND direkt oder indirekt an der Stabilisation von EIN3/EIL1 im Nucleus beteiligt, was eine deren Akkumulation fördert.

Die EBF1/2 Proteine wiederum kontrollieren den Abbau der Transkriptionsfaktoren EIN3/EIN-like 3 (EIL1). In Abwesenheit von Ethylen werden diese, vermittelt durch EBF1/2, über das 26S-Proteasom degradiert [64,65] und die Ethylenantwort so unterdrückt.

Des Weiteren gelangt der C-Terminus von EIN2 in den Zellkern, wo er direkt oder indirekt zur Stabilisierung der Transkriptionsfaktoren EIN3/EIL1 beiträgt. Der Transport von EIN2-CEND wird dabei durch eine *nuclear localization sequence* (NLS) vermittelt [62,66].

Dies führt wiederum zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren EIN3/EIL1, die weitere Transkriptionsfaktoren regulieren und schließlich zur Transkription der Ethylenantwortgene [63,67].

Zusätzlich zum bereits beschriebenen Signalweg wird eine weitere Signalweiterleitung ähnlich dem bakteriellen Zwei-Komponenten-Phosphorylierungssystem angenommen [68,69]. Bei dieser Signalweiterleitung kommt es vermutlich in Abwesenheit von Ethylen zur Autophosphorylierung des konservierten Histidinrestes der Typ-I Rezeptoren. Die Phosphorylgruppe wird zunächst innerhalb des Rezeptors auf ein konserviertes Aspartat in der Antwort-Regulator-Domäne übertragen, bevor es anschließend von einem Histidinphosphotransferprotein auf eine Empfänger-Domäne eines im Nukleus lokalisierten ARR-Proteins (*Arabidopsis response regulator*) übertragen wird [70]. Durch die Phosphorylgruppenübertragung auf das ARR, wird dieses aktiviert und damit eine Ethylenantwort ausgelöst [71].

1.5 Der Typ-II Ethylenrezeptor ETR2 aus *A. thaliana*

Der Rezeptor ETR2 wurde 1998 als *ETR1-like gene* mit einer möglichen Beteiligung an der Signalweiterleitung beschrieben [41]. Seitdem wurde ETR2 als Ethylenrezeptor identifiziert und in verschiedenen Studien eine Interaktion mit nachgeschalteten Komponenten des Signalweges nachgewiesen [46,72,73]. ETR2 gehört zur zweiten Unterfamilie der Ethylenrezeptoren und ist wie die anderen Ethylenrezeptoren für die Signalwahrnehmung und –weiterleitung zuständig. Der Typ-II Rezeptor besitzt zwar strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Typ-I Rezeptor ETR1, beiden ist der modulare Aufbau in den einzelnen Domänen gemein, aber es gibt auch deutliche Unterschiede. So besitzt ETR2 eine zusätzliche Transmembranhelix, sowie eine degenerierte Kinase-Domäne [41,42]. Auch über ihre jeweilige Rolle in der Signalweiterleitung unterscheiden sich die beiden Rezeptoren voneinander. Beispielsweise wird in *A. thaliana*-Keimlingen die ethyleninduzierte Krümmung des Apikalhakens durch ETR1 aktiviert, während ETR2 und die anderen drei Rezeptoren ERS1, ERS2 und EIN4 diese inhibieren [74]. Trotz dieser Unterschiede, sind die Typ-II Rezeptoren noch weitestgehend unerforscht. So ist die Bedeutung der

unterschiedlichen Strukturelemente und die möglicherweise damit einhergehende veränderte Wirkungsweise bisher noch nicht genau aufgeklärt.

1.6 *Microscale Thermophoresis*

Die *Microscale Thermophoresis* (MST) ist eine analytische Messmethode zur Bestimmung molekularer Affinitäten. Dabei wird die Bewegung von Molekülen in mikroskopischen Temperaturgradienten ausgenutzt. Ein Infrarot-Laser erzeugt einen lokalen Temperaturgradienten, bei dem ein definierter Temperaturanstieg von 2 – 6 K vorliegt. Dies sorgt für eine Bewegung von Molekülen ins Temperaturfeld oder aus diesem hinaus. Die dabei vorliegende Abhängigkeit zwischen Temperaturfluss und Molekülbewegung wurde erstmals 1856 von Ludwig beobachtet [75] und wird daher als Ludwig-Soret Effekt oder Thermophoresis bezeichnet. Die Thermophoresis eines Moleküls ist wiederum abhängig von seiner Größe, seiner Ladung und Interaktionen mit dem Lösungsmittel. Wird einer dieser Parameter z.B. durch die Bindung eines Interaktionspartners verändert, lässt sich dies mittels *Microscale Thermophoresis* messen [76,77].

Die Detektion von Molekülbewegungen erfolgt bei der *Microscale Thermophoresis* mittels Fluoreszenzdetektion. Zu analysierenden Moleküle werden entweder über Tryptophanfluoreszenz detektiert oder vor der Messung mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die fluoreszenzmarkierten Moleküle werden im Verlauf der Messung angeregt und die resultierende Emission gemessen. Durch Erhitzen einer Probe wird nun eine Molekülbewegung und damit einhergehend eine Änderung der Fluoreszenz hervorgerufen, welche detektiert werden kann [78].

1.7 *Fluorescein arsenical hairpin binder* (FLASH)

Fluorescein arsenical hairpin binder, kurz FLASH ist ein kleiner biarsenischer Fluoreszenzfarbstoff. Seine Struktur ist von Fluorescein abgeleitet, wobei zwei zusätzliche Arsen(III)-Ionen vorhanden sind, welche als Komplex mit Ethandithiol (EDT_2) vorliegen. Unter Verdrängung von EDT_2 kann FLASH ebenfalls kovalente Bindungen mit Cysteinresten

ausbilden. Um dies für die gezielte Markierung von Proteinen anwendbar zu machen kann die Sequenz eines optimierten Bindemotivs, welches vier Cysteine enthält (Tetracysteinmotiv) in eine Proteinsequenz integriert werden und der FIAsh-Farbstoff auf Grund seiner hohen Affinitäten zur selektiven Bindung verwendet werden [79]. Im ungebundenen Zustand ist FIAsh nicht fluoreszierend, erst nach Bindung an ein Tetracysteinmotiv kann die FIAsh-Fluoreszenz angeregt werden. Der schematische Ablauf einer solchen Markierungsreaktion ist in Abb. 1.4 dargestellt.

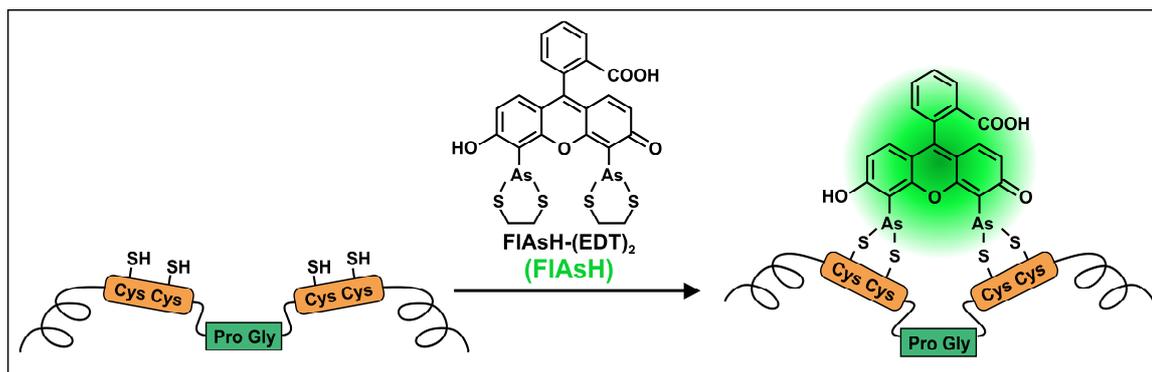


Abb. 1.4.: Spezifische Markierung eines Tetracysteinmotivs mit FIAsh. Im Komplex mit Ethandithiol (EDT_2) fluoresziert FIAsh nicht. Bei der Bindung an ein Tetracysteinmotiv wird EDT_2 verdrängt und eine kovalente Bindung zwischen den Arsen(III)ionen des FIAsh-Farbstoffes und den freien Thiolgruppen der Cysteinreste ausgebildet. In Folge dieser Bindung ist eine Anregung und Messung der Fluoreszenz möglich. Abbildung modifiziert nach Scheck & Schepartz [80].

Die auf diese Weise markierten Proteine können vielfältige Anwendung wie z.B. in der Fluoreszenzmikroskopie oder bei FRET-Messungen finden. Dadurch, dass die genaue Position des Farbstoffs innerhalb der Proteinsequenz bekannt ist, eignet sich FIAsh zusätzlich zur Untersuchung von Konformationsänderungen [81,82]. Ein weiterer Vorteil von FIAsh ist seine geringe Größe von nur etwa 0,7 kDa, wodurch das Auftreten von sterischen Hinderungen und eine damit einhergehende Beeinflussungen der Proteinstruktur und -funktion minimiert werden kann. Außerdem eignet sich der Farbstoff zur Markierung von membranängigen Protein, da er selber membranpermeable ist. Auch weitere FIAsh-Derivate wie ReAsH sind verfügbar, was eine perspektivische Anwendbarkeit weiter verbessert [79,82].

1.8 Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen anhand der Fluoreszenzlebenszeit und Anisotropie

Die Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (*fluorescence lifetime imaging microscopy*, FLIM) dient zur mikroskopischen Analyse der Fluoreszenzlebenszeit eines Fluorophors in lebenden Zellen. Zur Charakterisierung von Fluoreszenzprozessen dient eine Reihe von Parametern, die Fluoreszenz-Intensität, -Lebenszeit und Polarisation [83]. Die Fluoreszenz-Lebenszeit meint dabei die durchschnittliche Zeit, die ein Fluorophor im angeregten Zustand verweilt [84]. Diese wird von verschiedenen Umgebungsfaktoren beeinflusst. Variationen im pH-Wert, Anwesenheit von Quencher-molekülen (Sauerstoff oder Ionen), aber auch Konformationsänderungen oder Protein-Protein-Interaktionen können zu einer Änderung der Fluoreszenzlebenszeit führen [85–87].

Bei FLIM werden Fluorophore über mehrere Zyklen mit einem gepulsten Laser angeregt und die Emission der einzelnen Photonen zeitaufgelöst detektiert („*Time-correlated single photon counting*“). Aus dem resultierenden Fluoreszenz Lebenszeit Histogramm, das die exponentielle Abnahme der Fluoreszenz nach Anregung darstellt, wird die mittlere Lebenszeit des Fluorophors bestimmt. Um diese Technik zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen zu verwenden, ist die räumliche Nähe eines zweiten (Akzeptor-)Fluorophors nötig, auf welches Teile der Anregungsenergie des (Donor-)Fluorophors übertragen werden. Dieser strahlungsfreie Energietransfer wird Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) genannt und dient zur Quantifizierung von Protein-Protein-Interaktionen [88].

Findet ein solcher Energietransfer zwischen Donor und Akzeptor statt, hat dies eine geringere Emission von Photonen (verringerte Fluoreszenzintensität) und eine verkürzte Fluoreszenzlebenszeit des Donorfluorophors zur Folge [89]. Dieser Effekt wird auch als Fluoreszenzlöschung (Quenching) bezeichnet. Die Lebenszeit eines Donors alleine in Relation zu einem Donor-Akzeptor-Paar in einem Protein-Protein-Komplex, gibt somit Aufschluss über auftretende Protein-Protein-Interaktionen. Zudem gibt das Maß der Reduktion einen Anhaltspunkt über die Stärke der Interaktion. Dieses Maß wird als FRET-Effizienz angegeben und kann direkt aus der Fluoreszenz-Lebenszeit bestimmt werden (FRET-FLIM) [90].

Ein weiterer Parameter, der zur Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen verwendet werden kann, ist die bereits erwähnte Fluoreszenzpolarisation. Fluorophore besitzen elektrische Dipolmomente, wodurch auch die emittierte Fluoreszenz Dipol-Charakteristika aufweist. Dies wird bei Verwendung der Polarisations-aufgelösten Fluoreszenz-Mikroskopie ausgenutzt. Dabei werden die Fluorophore, die sich parallel zur Anregungsrichtung befinden, durch linear polarisiertes Licht angeregt. Dieser Prozess wird als Photoselektion bezeichnet. Die Fluoreszenzintensität wird vertikal und horizontal zur Polarisationsrichtung der Anregungsquelle gemessen. Anhand dieser Informationen lässt sich die Anisotropie r berechnen, welche als Maß für die freie Beweglichkeit von Molekülen angesehen werden kann [91].

Eine Abnahme der Anisotropie, was gleichbedeutend mit einer Fluoreszenzdepolarisation ist, kann durch Änderungen der Rotationsfreiheit oder durch Energietransfer begründet sein. Faktoren, welche die Rotationsfreiheit beeinflussen sind die Temperatur und Viskosität der Umgebung und das Volumen des Körpers [84]. Letzteres kann durch auftretende Protein-Protein-Interaktionen beeinflusst werden. Durch Fusion an ein Protein, wird die Rotationsfreiheit vom Fluorophor behindert und der r -Wert steigt. Ein Energietransfer zwischen zwei identischen Fluorophoren (homo-FRET) sorgt hingegen dafür, dass der r -Wert sinkt, da es durch den Energieübertrag und die Emission durch das Akzeptor Fluorophor zu einer Depolarisation der Gesamtfluoreszenz kommt. Die mittlere Fluoreszenzlebenszeit dieser (gleichen) Fluorophore wird durch diese Art des Energietransfers nicht beeinflusst. Bei Interaktionen zwischen einem Donor-Fluorophor und einem Akzeptor-Fluorophor mit unterschiedlichen Fluoreszenzspektren (hetero-FRET) steigt der r -Wert eher an, da hier durch die Interaktion lediglich die Rotationsfreiheit des Donor-Moleküls weiter eingeschränkt wird. Der Depolarisationseffekt entfällt hier, da die Emission in einem anderen Fluoreszenzspektrum erfolgt.

Durch die vergleichende Analyse der Fluoreszenzlebenszeit und der Anisotropie eines Donor-Fluorophors können somit Protein-Protein-Interaktionen weiter charakterisiert werden und geben Aufschluss über die Bildung von homo- und heteromeren Proteinkomplexen [92,93].

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Ethylen ist ein wichtiges Hormon in der Regulation von pflanzlichen Wachstums- und Entwicklungsprozessen und hat agrarökonomisch eine große Bedeutung. Auch wenn viele Signalkomponenten des Ethylensignalweges bereits identifiziert sind, wurden die Regulationsmechanismen und strukturellen Eigenschaften beteiligter Proteine nur vereinzelt charakterisiert. Vor allem die an der Signalweiterleitung beteiligten Typ-II Rezeptoren sind noch wenig untersucht.

Der Fokus dieser Dissertation lag daher auf der biochemischen Charakterisierung von Typ-II Ethylenrezeptoren und den dabei involvierten Interaktionspartnern. Bisherigen Studien konnten verschiedene Interaktionspartner für die Typ-II Rezeptoren zwar nachweisen, aber die Interaktionen nicht quantitativ bestimmen. Quantitative Nachweise liefern jedoch wichtige Informationen um die Mechanismen der Signalwahrnehmung und -weiterleitung besser zu verstehen. Im Zuge dieser Arbeit sollte daher die Komplexbildung der Typ-II Rezeptoren mit anderen Signalkomponenten des Ethylensignalweges über fluoreszenzspektroskopische Methoden quantitativ bestimmt werden.

Durch Etablierung von geeigneten Expressions- und Reinigungsprotokollen sollte ETR2 in nativer Form und in hoher Reinheit gewonnen werden. Als Grundlage weiterer Versuche sollte die Funktionalität des isolierten Typ-II Rezeptors ETR2 durch CD-Spektroskopie und Bestimmung der enzymatischen Autokinaseaktivität im direkten Vergleich zum Typ-I Rezeptor ETR1 nachgewiesen werden.

Die *in vitro* Quantifizierung der Protein-Protein-Interaktionen sollte durch Etablierung geeigneter Messbedingungen über die Analyse thermophoretischer Molekülbewegungen erfolgen. Hierzu sollte zudem eine Methode zur positionsspezifischen Markierung von Membranproteinen etabliert werden.

Im Weiteren sollten nachgewiesene Rezeptor-Rezeptor-Interaktionen in *in planta* Studien analysiert werden, um so eine Quantifizierung dieser Interaktionen in der physiologischen Umgebung des ER zu ermöglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

| Gerätebezeichnung | Hersteller |
|---|---------------------------------------|
| ÄKTAprime plus | GE Healthcare, München |
| Analysen- und Präzisionswaagen | Sartorius, Göttingen |
| Autoklav | H+P Labortechnik, Oberschleißheim |
| Avanti® J-26 XP Standkühlzentrifuge | Beckman Coulter, Krefeld |
| BioDoc Analyze | Analytik Jena, Jena |
| Brutschrank | Memmert, Schwalbach |
| Cell Disruption System | Constant Systems, Daventry (England) |
| Circular Dichroism Spectropolarimeter J-715 | Jasco GmbH, Gross-Umstadt |
| DU 800 Spectrophotometer | Beckmann Coulter, Krefeld |
| Eppendorf Kühlzentrifuge 5810R und 5430R | Eppendorf, Hamburg |
| French Press 40 K Aufschlusszelle | Heinemann, Schwäbisch Gmünd |
| Infinite M200 PRO | Tecan, Männedorf (Schweiz) |
| Innova 44R Inkubationsschüttler | New Brunswick / Eppendorf, Hamburg |
| LS-55 Fluoreszenzspektrometer | Perkin Elmer GmbH, Rodgau Jügesheim |
| LSM 780 | Zeiss, Jena |
| Luftpolsterpipetten | Eppendorf, Hamburg |
| Luminescent Image Analyzer LAS-4000 mini | Fujifilm, Düsseldorf |
| Milli-Q-Gradient Wasserfilteranlage | Millipore, Schwalbach |
| Minispin R Minizentrifuge | Eppendorf, Hamburg |
| Monolith NT.115 | NanoTemper Technologies GmbH, München |
| MR 3001 Magnetrührer | Heidolph, Schwalbach |
| MS 2 Minishaker | IKA, Staufen |
| NanoQuant Platte | Tecan, Männedorf (Schweiz) |
| Optima™ L-80 XP Ultrazentrifuge | Beckman Coulter, Krefeld |
| PEQLAB Power Supply EV265 | Peqlab Biotechnologie, Erlangen |
| PerfectBlue Elektrophoresesystem | Peqlab Biotechnologie, Erlangen |
| PerfectBlue Semi-Dry Elektroblotter | Peqlab Biotechnologie, Erlangen |
| Pflanzenkammer Percival AR-41L2 | CLF Plant Climatics GmbH, Wertingen |
| Polymax 1040 Taumelschüttler | Heidolph, Schwalbach |
| Quarz-Küvette, zylindrisch transparent | Hellma Analytics, Mühlheim |

| | |
|---------------------------------------|-------------------------------------|
| Rotoren: JLA 8.1000, JA-25.50, Ti70.1 | Beckman Coulter , Krefeld |
| Semi-Halbmikro Quartz-Küvette | Perkin Elmer GmbH, Rodgau Jügesheim |
| Thermocycler T Professional | Analytik Jena, Jena |
| Thermomixer compact/comfort | Eppendorf, Hamburg |
| Ultrospec 2100 pro UV/VIS Photometer | Thermo Fisher Scientific, Schwerte |
| Umwälzkühler HAAKE WKL 26 | Thermo Electron, Karlsruhe |

2.1.2 Chromatographie- und Verbrauchsmaterialien

| Material | Hersteller |
|--|------------------------------------|
| Amicon Ultrafiltratoren (3 kDa, 30 kDa, 50 kDa MWCO) | Millipore, Schwalbach |
| Deckgläser (0,17 mm) | Thermo Scientific Menzel, Schwerte |
| Einwegspritzen | Braun, Melsungen |
| Halbmikroküvetten | Hartenstein, Würzburg |
| HisTrap™ FF Säulen [5 mL, 16 x 25 mm] | GE Healthcare, München |
| HisTrap™ HP Säulen [5 mL, 16 x 25 mm] | GE Healthcare, München |
| HisTrap™ HP Säulen [1 mL, 7 x 25 mm] | GE Healthcare, München |
| Nitrocellulosemembran (0,45 µm Porengröße) | Hartenstein, Würzburg |
| Objetträger | Thermo Scientific Menzel, Schwerte |
| PD Mini Trap G-25 Säulen | GE Healthcare, München |
| PD-10 G-25 Säulen | GE Healthcare, München |
| Petrischalen | Hartenstein, Würzburg |
| Pipettenspitzen | Hartenstein, Würzburg |
| Reaktionsgefäße | Greiner-Bio One, Frickenhausen |
| Röhrchen mit Schraubverschluss (15 mL/50 mL) | Greiner-Bio One, Frickenhausen |
| Spritzenvorsatzfilter | GE Healthcare, München |

2.1.3 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden die eingesetzten Chemikalien in analytischer Qualität (p.a.) bei den folgenden Firmen bezogen:

Anatrace (Maumee, USA), AppliChem (Darmstadt), Becton Dickinson (Heidelberg), Bio-Rad (München), Carl Roth (Karlsruhe), Carlo Erba (Renningen), Glycon Biochemicals (Luckenwalde), Grüssing (Filsum), Kurt Obermeier GmbH & Co. KG (Bad Berleburg), Millipore (Schwalbach), Roche (Mannheim), Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg), Serva (Heidelberg) Sigma-Aldrich (Mannheim), Thermo Fisher Scientific (Schwerte), VWR (Darmstadt)

Standardmäßig wurde demineralisiertes Wasser, welches durch eine Milli-Q-Wasserfilteranlage steril filtriert und UV-entkeimt wurde, zum Ansetzen der Kulturmedien und Puffer verwendet. Dieses wird im Folgenden als ddH₂O bezeichnet.

2.1.4 Antikörper

2.1.4.1 Primärantikörper

1. Anti-His-HRP Antikörper (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)

Es handelt sich um einen monoklonalen Antikörper, der an Proteine mit einem Polyhistidin-Tag bindet. Der Anti-His Antikörper ist direkt an die Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt und benötigt zur Detektion keinen Zweitantikörper. Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:10.000 eingesetzt.

2. Anti-EIN2 Antikörper (GenScript, New Jersey, USA)

Es handelt sich um einen aus Maus stammenden Peptidantikörper, der Epitope des Proteins EIN2 innerhalb der AS 888-903 bindet. Der Antikörper wurde 1:10.000 verdünnt eingesetzt. Zur Detektion des EIN2 Antikörpers wird der Sekundärantikörper ECL Anti-Maus-IgG Antikörper benötigt.

3. Anti-DnaK Antikörper (Enzo Life Science, Lörrach)

Dieser Antikörper bindet an das prokaryotische Hitzeschockprotein DnaK. Es handelt sich um einen monoklonalen Antikörper aus Maus, der in einer Verdünnung von 1:10.000 eingesetzt wurde. Die Detektion des Anti-DnaK Antikörpers erfolgt unter Verwendung des ECL Anti-Maus-IgG Antikörpers.

2.1.4.2 Sekundärantikörper

a) ECL Anti-Maus-IgG Antikörper (GE Healthcare, München)

An die HRP gekoppelter Antikörper, der für die Detektion der Primärantikörper Anti-EIN2 bzw. Anti-DnaK eingesetzt wurde. Der Sekundärantikörper wurde in einer 1:10.000 Verdünnung verwendet.

Die Antikörper wurden in einer 5 % (w/v) Milchpulver-Lösung (vgl. 2.7.8), entsprechend der Angaben, verdünnt.

2.1.5 Kommerzielle Kits

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|--|
| illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit | GE Healthcare, München |
| Monarch® Plasmid Miniprep Kit | New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main |
| Western Blotting Luminol Reagent | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |

2.1.6 Bakterienstämme

Tab. 2.1.: Zur Klonierung und Expression verwendete Bakterienstämme

| Bezeichnung | Hersteller/Referenz | Beschreibung/Resistenz |
|--------------|---|--|
| XL1-Blue | Stratagene, La Jolla, USA | <i>E. coli recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F ⁺ <i>proAB lacI^q ΔM15 Tn10</i> (Tet ^r)] |
| BL21 (DE3) | Stratagene, La Jolla, USA | <i>E. coli B F⁻ ompT hsdS(r_B⁻m_B⁻) dcm gal λ(DE3)</i> |
| C43 (DE3) | Lucigen Corporation, Middleton, USA; [94] | <i>E. coli F⁻ ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) |
| GV3101 pMP90 | [95] | Gen ^R , Rif ^R |

2.1.7 Vektoren

Tab. 2.2.: Ausgangsvektoren für die Expression in *E. coli*

| Vektor | Hersteller | Resistenzgen | Beschreibung |
|-----------|---------------------------|------------------|---|
| pET15b(+) | Merck KGaA, Darmstadt | Amp ^R | N-terminaler Deka-Histidin-Tag, IPTG-induzierbarer T7-RNA Polymerase Promotor |
| pET16b | Merck KGaA, Darmstadt | Amp ^R | N-terminaler Deka-Histidin-Tag, IPTG-induzierbarer T7-RNA Polymerase Promotor |
| pET30a | Merck KGaA, Darmstadt | Kan ^R | N-terminaler Hexa-Histidin-Tag, N-terminaler S-Tag, IPTG-induzierbarer T7-RNA Polymerase Promotor |
| pGEX-4T-1 | GE Healthcare, München | Amp ^R | N-terminaler GST-Tag, IPTG-induzierbarer T7-RNA Polymerase Promotor |
| pRARE | Merck KGaA, Darmstadt | CM ^R | tRNA Gene codieren für in <i>E. coli</i> selten genutzte Aminosäurecodons |

Tab. 2.3.: Vektoren zur Gateway-Klonierung und Expression in *N. benthamiana*

| Vektor | Resistenzgen | Beschreibung |
|---------------|-------------------|---|
| pENTR/D-TOPO | Spec ^R | Gateway [®] Entry Vektor |
| pABindmVenus | Spec ^R | Destinationsvektor, C-terminales mVenus aus <i>A. victoria</i> , XVE-induzierbarer 35S Promotor |
| pABindmCherry | Spec ^R | Destinationsvektor, C-terminales mCherry aus <i>A. millepora</i> , XVE-induzierbarer 35S Promotor |
| pAB119mV | Spec ^R | Destinationsvektor, C-terminales mVenus aus <i>A. victoria</i> und mCherry aus <i>A. millepora</i> , XVE-induzierbarer 35S Promotor |
| ER-rb | Kan ^R | mCherry aus <i>A. millepora</i> , mit N-terminalem Signalpeptid und C-terminalem Retentionssignal, konstitutive Genexpression |
| p19 | Kan ^R | Codiert für Protein p19 aus <i>tomato bushy stunt virus</i> , vermindert Gen-Silencing [⁹⁶] |

2.1.8 Rekombinante Plasmide zur Klonierung und Expression in *E. coli*

1. pET16b_ETR1, pET16b_ETR1^{H353E}, pET15b_ETR1^{H353A}

Der Ursprungsvektor mit ETR1 aus *A. thaliana* [UniProt: P49333] wurde von Dr. J. Voet van Vormizeele bereitgestellt [97].

2. pET16b_ETR1_FIAsh⁴³⁻⁵⁴, pET16b_ETR1_FIAsh⁷⁴⁻⁸⁵ und pET16b_ETR1_FIAsh¹²³⁻¹³²

Die beiden Konstrukte wurden aus dem ursprünglichen Vektor pET16b_ETR1 kloniert. Es wurden optimierte Sequenzen der Tetracysteinmotive ausgehend von Martin *et al.* in ETR1 eingefügt [98]. Folgende AS-Substitutionen wurden in ETR1 vorgenommen:

| Bezeichnung | AS-Substitution |
|--------------------------------------|--|
| pET16b_ETR1_FIAsh ⁴³⁻⁵⁴ | V43H K44R K45W S46C A47C V48P F49G P50C Y51C R52K W53T V54F |
| pET16b_ETR1_FIAsh ⁷⁴⁻⁸⁵ | W74H T75R F76W T77C T78C H79G S80P R81C T82C V83K A84T L85F |
| pET16b_ETR1_FIAsh ¹²³⁻¹³² | K123N N124C K125C A126P A127G E128C L129C D130M R131E E132P |

Die Klonierung erfolgte über eine PCR-basierte Mutagenese nach Follo & Isodoro (vgl. 2.2.3.2).

3. pET16b_ETR1^{1-157 C4S C6S}

Die Klonierung dieses Vektors erfolgte durch M. Sc. L. Müller (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf). Das Konstrukt wird im Folgenden als ETR1-TM bezeichnet.

4. pGEX-4T-1_TEV_ETR2_H₁₀

ETR2 aus *A. thaliana* [UniProt: Q0WPQ2] wurde als Codon-optimierte DNA bei GenScript (New Jersey, USA) bezogen und über die Restriktionsschnittstellen SmaI und XhoI von Dipl.-Biol. C. Fritz in den Vektor pGEX-4T-1 kloniert. Durch Verwendung dieses Vektors wird N-terminal die Glutathion-S-Transferase (GST) an ein Zielgen fusioniert. In diesem Ursprungsvektor pGEX-4T-1_ETR2 wurde die Thrombin-Schnittstelle durch eine TEV-Schnittstelle ersetzt. Zudem wurde C-terminal ein Dekahistidin-Tag an das ETR2-Gen angefügt. Die Klonierung erfolgte hierbei über die von Follo & Isodoro etablierte PCR-basierte Mutagenese (vgl. 2.2.3.2).

5. pET15b(+)_TEV_EIN2⁴⁷⁹⁻¹²⁹⁴

Das Gen EIN2 aus *A. thaliana* [UniProt: Q9S814] wurde im Vektor pET15b(+)_EIN2⁴⁷⁹⁻¹²⁹⁴ von Dr. M. Bisson-Ritter zur Verfügung gestellt. Die Thrombin-Schnittstelle wurde in dieser Arbeit durch eine TEV-Schnittstelle ersetzt. Die Klonierung erfolgte hierbei über eine von Follo & Isidoro etablierte PCR-basierte Mutagenese-Technik (vgl. 2.2.3.2). Das Protein wird im Folgenden als EIN2-CEND bezeichnet.

6. pET30a_CTR1_CFP

Dieser Vektor, enthält das Gen CTR1 aus *A. thaliana* [UniProt: Q05609] und ist C-terminal mit dem Fluoreszenzprotein mCerulean fusioniert. Der Ursprungsvektor wurde von Dipl.-Biol. K. Förster [⁹⁹] bereitgestellt.

7. pENTR/D-TOPO_ERS1 und pENTR/D-TOPO_ERS2

Die Ursprungsvektoren pBR7RWG2_ERS1 und pBR7RWG2_ERS2 wurden von Prof. K. Harter (Universität Tübingen) zur Verfügung gestellt. Die kodierenden Sequenzen für ERS1 [UniProt: Q38846] und ERS2 [UniProt: P93825] wurden mittels *pENTRTM Directional TOPO[®] Cloning Kit* (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) in den Vektor pENTR/D-TOPOTM kloniert (vgl. 2.2.3.4.1). Die so erzeugten Vektoren dienten als *entry clone* zur Rekombination mit den gewünschten Destinationsvektoren bei Verwendung des Gateway[®] Klonierungssystems.

2.1.9 Rekombinante Plasmide zur Expression in *N. benthamiana***1. pABindmCherry_ERS2, _ERS1 und _CLV2**

Die Ursprungsvektoren pABindmCherry, sowie pABindmCherry_CLV2 wurden von Dr. A. Bleckmann zur Verfügung gestellt [¹⁰⁰]. Die kodierende Sequenz von *Receptor-like protein* CLAVATA2 (CLV2) stammt aus *A. thaliana* [UniProt: O80809]. Die Gene ERS2 und ERS1 wurden mittels LR-Clonase Reaktion in den Vektor pABindmCherry überführt (vgl. 2.2.3.4.2). Die Konstrukte werden im Folgenden als ERS2-, ERS1- bzw. CLV2-mCherry bezeichnet.

2. pABindmCherry_BT12

BT12 aus *A. thaliana* [UniProt: Q9SUT9] im Vektor pABindmCherry wurde von Prof. R. Simon (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt und wird nachfolgend BT12-mCherry genannt.

3. pABindmCherry_GmMan¹⁻⁴⁹

Die Klonierung der α -1,2-Mannosidase aus *Glycine max* (GmMan¹⁻⁴⁹) [Uniprot: Q9SEH8] [¹⁰¹] in den Vektor pABindmCherry erfolgte durch M. Sc. C. Hoppen (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf). Dieses Konstrukt wird im Folgenden als Golgi-mCherry bezeichnet.

4. ER-rb

Dieser Vektor wurde ursprünglich von Dr. M. Bisson-Ritter zur Verfügung gestellt [⁶⁰]. Hierbei ist N-terminal ein Signalpeptid aus *A. thaliana Wall-associated receptor kinase 2* (AtWAK2) [UniProt: Q9LMP1] und C-terminal ein Retentionssignal bestehend aus 4 Aminosäuren (His-Asp-Glu-Leu) an das Fluoreszenzprotein mCherry fusioniert [¹⁰²]. Das Konstrukt wird im Folgenden als ER-mCherry aufgeführt.

5. pABindmVenus_ERS2

Der Ausgangsvektor pABindmVenus wurde von M. Sc. R. Burkart (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) bereitgestellt. ERS2 wurde über eine LR-Clonase Reaktion (vgl. 2.2.3.4.2) in den Vektor pABindmVenus eingefügt und nachfolgend ERS2-mVenus genannt.

6. pAB119mV_ERS2

Der Ausgangsvektor pABindFRET wurde von Dr. A. Bleckmann zur Verfügung gestellt [¹⁰⁰]. In diesem Vektor wurde der Fluorophor GFP durch mVenus ersetzt und ERS2 eingefügt. Die Klonierung erfolgte über das Gibson-*Assembly* (vgl. 2.2.3.3). Das Protein wird im Folgenden ERS2-mVenus-mCherry genannt.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Bestimmung der Nukleinsäuren-Konzentration

Die Quantifizierung von Nukleinsäuren erfolgte über photometrische Bestimmung am Infinite M200 Pro Plattenlesegerät unter Verwendung einer NanoQuant Platte (Tecan, Männedorf, Schweiz) bei 260 nm. Zur Bestimmung der DNA-Reinheit wurde zudem die Extinktion bei 280 nm gemessen und das Verhältnis der beiden Extinktionswerte gebildet. Reine doppelsträngige DNA liegt bei einem Extinktionsverhältnis von 1,8 vor.

2.2.2 Isolation von Plasmid-DNA

2.2.2.1 DNA-Amplifikation und Plasmidpräparation aus *E. coli*

Zur Plasmidvermehrung wurden 5 mL 2YT-Medium mit je einer Kolonie des gewünschten Plasmids, transformiert im *E. coli* Stamm XL1-blue, angeimpft (vgl. 2.3.2). Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37 °C und 180 rpm. Die Plasmid-DNA wurde mittels Monarch Plasmid Miniprep Kit (NEB GmbH, Frankfurt/Main) aus den Zellen isoliert und in einem Volumen von 40 µL eluiert.

2.2.2.2 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von isolierter Plasmid-DNA erfolgte bei Microsynth Seqlab (Göttingen).

2.2.3 Klonierung und gerichtete Mutagenese

2.2.3.1 DNA-Amplifikation über Polymerasekettenreaktion

Bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) werden DNA-Fragmente spezifisch amplifiziert. Die eingesetzten Oligonukleotide (Primer) bedingen hierbei die Spezifität der späteren DNA-Fragmente. Bei der PCR werden drei Reaktionsschritte durchgeführt: Denaturierung der doppelsträngigen DNA, das Anlagern spezifischer Primer an die Einzelstränge (Annealing) und die Synthese des neuen Komplementärstranges durch eine DNA-Polymerase (Elongation). Die PCR wird in mehreren Zyklen wiederholt und vervielfacht dabei das Zielfragment. Die Polymerasekettenreaktion erfolgte unter Verwendung der

Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase (NEB GmbH, Frankfurt/Main). Die eingesetzten Primer wurden bei Sigma-Aldrich (Mannheim) bezogen. Der PCR-Ansatz erfolgte entsprechend des nachfolgendem Schemas und wurde mit dem in Tab. 2.4 aufgeführten Programm durchgeführt.

| | |
|---|------------------------------|
| PCR-Ansatz (50 μL): | [Endkonzentration] |
| 10 μ L 5x Phusion HF-Puffer | [1x Puffer] |
| 1 μ L dNTPs | [10 mM] |
| 2.5 μ L 3'-Primer | [10 μ M] |
| 2.5 μ L 5'-Primer | [10 μ M] |
| 1 μ L Template DNA | |
| 0.5 μ L Phusion DNA Polymerase | [2 U μ L ⁻¹] |

Tab. 2.4.: Thermocycler-Programm zur Amplifikation von DNA-Fragmenten. Hierbei wurde die Annealing-Temperatur (x) in Abhängigkeit der verwendeten Primer und die Elongationszeit (y) nach Größe des zu amplifizierenden Fragments gewählt.

| T [°C] | Zeit [s] | Zyklen |
|--------|----------|--------|
| 98 | 30 | 1 |
| 98 | 10 | |
| x | 30 | 35 |
| 72 | y | |
| 72 | 600 | 1 |
| 4 | ∞ | |

2.2.3.2 Round the horn site-directed Mutagenese

Bei der *Round the horn site-directed* Mutagenese handelt es sich um eine PCR-basierte Mutagenese-Methode nach Follo & Isodoro [103]. Die gewünschte Mutation liegt hierbei am 5'-Ende eines oder beider Oligonukleotide. Bei dieser Methode werden die Primer so konzipiert, dass sie den gesamten Vektor amplifizieren und dabei keine Basendeletionen erzeugen. Der *reverse* Primer beginnt dafür am komplementären Strang der Template-DNA an der ersten Base bevor der *forward* Primer ansetzt. Die Oligonukleotide werden am 5'-Ende phosphoryliert, um den linearisierten Vektor nach der PCR über eine Ligation wieder zirkulär zu verknüpfen. Die PCR für die Mutagenese erfolgte wie in 2.2.3.1 aufgeführt.

Die eingesetzten Oligonukleotide sind im Anhang 6.4 (vgl. Tab. 6.11) aufgeführt. Als Template-DNA wurden 10 ng DNA eingesetzt.

Nach der PCR wurde die methylierte Template-DNA entfernt, indem das amplifizierte Plasmid zunächst mit 0,5 µL DpnI versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mittels Hitzeinaktivierung des Enzyms durch 20-minütige Inkubation bei 80 °C beendet. Hierdurch soll vermieden werden, dass sich die Template-DNA im nächsten Schritt wieder ligiert und zu falsch-positiven Ergebnissen führt.

Zur Ligation der linearisierten DNA wurde der PCR-Ansatz nach Behandlung mit DpnI über eine T4-Ligase ligiert. Hierfür wurde der Ligationsansatz wie in Tab. 2.5 angesetzt und anschließend für 15 min bei RT inkubiert. Nach der Ligation wurde der Ansatz wie unter 2.3.2.1 in *E. coli* transformiert.

Tab. 2.5.: Pipettierschema des Ligationsansatzes

| V [µL] | Bestandteil |
|--------|--------------------|
| 10 | PCR-Ansatz |
| 4 | 5x RL-Puffer |
| 1 | T4-Ligase |
| 5 | ddH ₂ O |

2.2.3.3 Gibson-Assembly

Im *Gibson-Assembly* werden einzelne DNA-Fragmente durch komplementäre Sequenzüberhänge miteinander verknüpft. Hierfür werden PCR-Fragmente zunächst am 5'-Ende von einer 5'-Exonuclease abgebaut, so dass einzelsträngige Überhänge entstehen. Anschließend lagern sich komplementäre Stränge aneinander. Der fehlende Strangbereich wird durch eine Phusion DNA-Polymerase synthetisiert und über eine Taq DNA-Ligase verbunden. Da sich nur komplementäre Bereiche aneinanderlagern können, können zeitgleich mehrere Fragmente in einem Reaktionsansatz miteinander verbunden werden [104].

Hierzu wurden die DNA-Fragmente zunächst über PCR amplifiziert. Hierbei erfolgte die Amplifikation der Vektor-Fragmente wie in Tab. 2.4 beschrieben. Das PCR-Programm des eingesetzten Inserts wurde um eine Annealing-Temperatur ergänzt, da die hier

verwendeten Primer zunächst, auf Grund der angefügten Überhänge, nicht vollständig an die Template-DNA binden können. Die verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang 6.4 (vgl. Tab. 6.12) aufgeführt. Es wurden 100 ng Template-DNA in der PCR eingesetzt.

Tab. 2.6.: Thermocycler-Programm zur Amplifikation des Gibson-Inserts. Hierbei wurde die Annealing-Temperatur (x) in Abhängigkeit der verwendeten Primer und die Elongationszeit (y) nach Größe des zu amplifizierenden Fragments gewählt. X1 und Y1= Bedingungen für Primer ohne Überhänge, X2 und Y2 für Primer mit Überhängen.

| T [°C] | Zeit [s] | Zyklen |
|--------|----------|--------|
| 98 | 30 | 1 |
| 98 | 10 | |
| X1 | 30 | 10 |
| 72 | Y1 | |
| 98 | 10 | 20 |
| X2 | Y1 | |
| 72 | 600 | 1 |
| 4 | ∞ | |

Die PCR-Ansätze wurden anschließend über ein Agarosegel aufgetrennt, die DNA-Fragmente aus dem Agarosegel isoliert (vgl. 2.2.3.5) und die DNA-Konzentration bestimmt (vgl. 2.2.1). Die vier DNA-Fragmente wurden für das Gibson-Assembly in einem Verhältnis von 1:1:1:1 in einem Gesamtvolumen von 2,5 µL eingesetzt. Dieser DNA-Ansatz wurde mit 7,5 µL Gibson-Mastermix versetzt und für 1 h bei 50 °C inkubiert. Anschließend wurde der Gibson-Ansatz wie unter 2.3.2.1 beschrieben in *E. coli* transformiert.

2.2.3.4 Gateway Klonierungssystem

2.2.3.4.1 pENTR/D-TOPO Klonierung

Für die transiente Expression in *N. benthamiana* war es notwendig die jeweiligen Zielgene in Expressionsvektoren fusioniert mit Fluorophoren vorliegen zu haben. Zunächst wurde das jeweilige Gen in einen pENTR/D-TOPO Vektor eingebracht, der dann als sogenannter *entry clone* zur Rekombination mit einem Destinationsvektor zur Verfügung stand.

Um den *entry clone* zu erzeugen, wurde das DNA-Fragment mit dem Zielgen zunächst über PCR amplifiziert (2.2.3.1). Die verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang 6.4

(vgl. Tab. 6.13) aufgeführt. Anschließend wurde das PCR-Fragment über ein Agarosegel gereinigt (vgl. 2.2.3.5). Das Einfügen des DNA-Fragments in den Vektor pENTR/D-TOPO™ erfolgte unter Verwendung des *pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kit* (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) nach Herstellerangaben. Anschließend wurde der pENTR/D-TOPO-Ansatz wie unter 2.3.2.1 beschrieben in *E. coli* transformiert.

2.2.3.4.2 Rekombination über LR-Clonase

Die Expressionsvektoren für die transiente Expression in *N. benthamiana* erfolgten durch Rekombination des jeweiligen pENTR™/D-TOPO® Vektors mit dem gewünschten Destinationsvektor unter Verwendung des Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme mix (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) nach Herstellerangaben. Anschließend wurde der pENTR/D-TOPO-Ansatz wie unter 2.3.2.1 beschrieben in *E. coli* transformiert.

2.2.3.5 Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten entsprechend ihrer Größe erfolgte über Agarose-Gelelektrophorese. Hierbei wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren im elektrischen Feld zur Anode und werden dabei im Agarosegel abhängig von ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Hierfür wurde 1 %ige (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer mit 0,5 µg mL⁻¹ Ethidiumbromid versetzt und in den Laufstand der Elektrophoresekammer gefüllt. Nach Erstarren des Gels wurde es mit TAE-Puffer überschichtet. Die zu analysierenden Proben wurden mit DNA-Probenpuffer versetzt. Die Proben, sowie 6 µL des Größenstandards (1 kb DNA Ladder, NEB GmbH, Frankfurt/Main) wurden auf das Agarosegel aufgetragen. Die Trennung erfolgt bei 150 V für 30 bis 45 min.

Die DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und unter Verwendung des *illustra GFP PCR DNA and Gel Purification Kit* (GE Healthcare, München) aus dem Agarosegel nach Herstellerangaben isoliert.

50x Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer:

2 M Tris; 50 mM EDTA, 5,7 % (v/v) Essigsäure

10x DNA-Probenpuffer

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

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Nährmedien zur Anzucht von Bakterienzellen

Zur Anzucht der Bakterienzellen wurden zwei verschiedene Nährmedien eingesetzt:

2YT-Medium:

1,6 % (w/v) Bactopepton; 1 % (w/v) Hefeextrakt; 0,5 % (w/v) NaCl

TB-Medium:

1,2 % (w/v) Bactopepton; 2,4 % (w/v) Hefeextrakt; 0,4 % (w/v) Glycerin;
100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,6

Die Medien wurden sterilisiert, indem sie für 20 min bei 121 °C im Autoklaven erhitzt wurden. Für Agarplatten wurde dem 2YT-Medium 1,5 % (w/v) Agar vor dem Autoklavieren zugefügt. Nach dem Abkühlen des Mediums wurde dieses mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und in Petrischalen gegossen. Die Agarplatten wurden bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.3.2 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen durch Hitzeschock

Zur Transformation wurden 50 µL kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und mit 100 – 200 ng DNA versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 45 sec bei 42 °C einem Hitzeschock unterzogen und anschließend für 2 min auf Eis gekühlt. Es wurden 300 µL 2YT-Medium zugegeben und die Zellen für 60 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. 100 µL der Zellsuspension wurde auf Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert [modifiziert nach ¹⁰⁵].

Zur Plasmidvermehrung wurden *E. coli* XL1-blue Zellen verwendet. Die verwendeten *E. coli*-Stämme zur heterologen Expression sind in Tab. 2.1 aufgeführt (vgl. 2.1.6 und 2.1.8)

2.3.2.1 Transformation nach Klonierung und Mutagenese

Für Transformationen nach *Round-the-horn*-Mutagenese (vgl. 2.2.3.2) wurden 10 µL, nach *Gibson-Assembly* (vgl. 2.2.3.3) und Rekombination über LR-Clonase (2.2.3.4.2) 5 µL und nach pENTR/D-TOPO™ (2.2.3.4.1) 2 µL des jeweiligen Ligationsansatzes verwendet und in XL1-blue Zellen transformiert. Der Hitzeschock erfolgte wie zuvor beschrieben. Nach der 60-minütigen Inkubation wurden die Zellen zusätzlich bei 1.000 × g zentrifugiert. 100 µL des Überstandes wurden verworfen, die Zellen im restlichen Ansatz resuspendiert und 150 µL des Transformationsansatzes auf Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die jeweiligen Antibiotikaresistenzen der verwendeten *E. coli*-Stämme, sowie der rekombinanten Plasmide sind den Tab. 2.1 und Tab. 2.2 zu entnehmen. Ampicillin wurde in einer Konzentration von 100 µg mL⁻¹, Kanamycin von 25 µg mL⁻¹ und Chloramphenicol von 34 µg mL⁻¹ eingesetzt.

2.3.3 Transformation kompetenter *A. tumefaciens*-Zellen über Elektroporation

Zur Transformation wurden kompetente *Agrobacterium tumefaciens* des Stammes GV3101 pMP90 verwendet [95]. Es wurden 50 µL der kompetenten Agrobakterien auf Eis aufgetaut und mit 1 µL DNA versetzt. Die Zellen wurden 30 min auf Eis inkubiert, bevor sie in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette mit einer Spaltbreite von 1 mm (VWR Life Science Competence Center, Erlangen) überführt wurden. Die Transformation erfolgte bei 1,8 kV in einem Elektroporator 2510 (Eppendorf, Hamburg). Die Zellen wurden mit 200 µL 2YT-Medium versetzt, vorsichtig gemischt und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Der Ansatz wurde für 2 h bei 28 °C und 700 rpm, zur Ausprägung der Antibiotikaresistenz inkubiert. 150 µL des Transformationsansatzes wurden auf 2YT-Agarplatten mit den entsprechenden Selektionsmarkern ausplattiert und für 2 Tage bei 28 °C inkubiert.

Die Plasmide zur Expression in *N. benthamiana* (vgl. 2.1.9) wurden, mit Ausnahme von ER-mCherry, in den Agrobakterien Stamm GV3101 pMP90 transformiert, welcher zusätzlich das Plasmid p19 des *tomato bushy stunt virus* enthält [96].

2.3.4 Agrobakterien vermittelte Transformation in *N. benthamiana*-Blättern

2.3.4.1 Herstellung des Agrobakterien-Infiltrationsmediums

Als Vorstufe zur Transformation von Pflanzen ist zunächst die Einbringung des zu transformierenden Plasmids in Agrobakterien erforderlich (vgl. 2.3.3). Im nächsten Schritt werden die Agrobakterien kultiviert, in ein Infiltrationsmedium überführt und mit diesem die zu analysierenden Pflanzen infiltriert.

Zur Herstellung des Agrobakterien-Infiltrationsmediums wurden 5 mL 2YT-Medium (vgl. 2.3.1) mit je 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ der entsprechenden Antibiotika versetzt und mit einer transformierten *A. tumefaciens*-Kolonie angeimpft (vgl. 2.3.3). Die Agrobakterien-Kultur wurde bei 28 °C und 180 rpm für 18 h in einem Innova 44 R Inkubationsschüttler (Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Die Zellen wurden für eine weitere Stunde unter kontinuierlicher Reduktion der Temperatur auf 10 °C bei 180 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Agrobakterien für 15 min bei 2.500 \times g und 4 °C in einer Kühlzentrifuge 5810R (Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Das 2YT-Medium wurde vollständig abgenommen und die sedimentierten Agrobakterien in eiskaltem AS-Medium resuspendiert. Die Agrobakterien-Kultur wurde zur Einzelinfiltration auf eine OD₆₀₀ von 0,2 eingestellt. Zur Koexpression von zwei Plasmiden wurden die Zellen im Verhältnis 1:1 gemischt und ebenfalls auf eine optische Dichte von 0,2 eingestellt. Die Agrobakterien wurden anschließend für 2 bis 4 h auf Eis inkubiert.

AS-Medium:

5 % (w/v) Saccharose; 0,01 % (v/v) Silwet L-77; 5 mM MgSO₄; 5 mM Glucose;
450 μM Acetosyringon

2.3.4.2 Agrobakterien vermittelte Infiltration und transiente Expression in *N. benthamiana*-Blättern

Zur Infiltration wurden 4 bis 5 Wochen alte *N. benthamiana* Pflanzen (Botanischer Garten, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) verwendet. Zur Erhöhung des Dampfdruckes und damit zur Öffnung der Blattstomata wurden die Pflanzen vor der Infiltration für 6 bis 8 h in eine Anzuchtschale mit Wasser gestellt und mit einer Abdeckhaube bedeckt.

Die Pflanzen wurden anschließend mit Agrobakterien (vgl. 2.3.4.1) infiltriert. Die Agrobakterien-Kultur, mit den jeweiligen Expressionsplasmiden, wurde mit einer 1 mL-Spritze auf der abaxialen Blattseite in das *N. benthamiana* Blatt gespritzt. Die Pflanzen wurden für 3 bis 5 Tage in einer Pflanzenkammer Percival AR-41L2 (CLF Plant Climatics GmbH, Wertingen) inkubiert. Hierbei wurden sie für 14 h bei 21 °C belichtet und 10 h im Dunkeln bei 18 °C gehalten. Zur Induktion der Genexpression wurde die Blattunterseite mit 20 µM β-Estradiol und 0,1 % (v/v) Tween20 behandelt und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Blätter zur konfokalen Mikroskopie und Fluoreszenz-Lebensdauer Mikroskopie (FLIM) verwendet.

2.4 Heterologe Expression der rekombinanten Proteine in *E. coli*

2.4.1 Expression des Volllängenproteins ETR1 und ETR1-Mutanten

Die heterologe Genexpression des Volllängenproteins ETR1 erfolgte ausgehend von Voet van Vormizeele & Groth [106]. C43 (DE) Zellen wurden wie unter 2.3.2 beschrieben mit dem Plasmid pET16b_ETR1, pET16b_ETR1^{H353E}, pET15b_ETR1^{H353A}, pET16_ETR1_FIAsh⁴³⁻⁵³, pET16_ETR1_FIAsh⁷⁴⁻⁸⁵ oder pET16_ETR1_FIAsh¹²³⁻¹³² transformiert. Als Vorkultur wurden 500 mL 2YT-Medium in 1 L-Flasken mit 100 µg mL⁻¹ Ampicillin versetzt und mit einer Kolonie der transformierten C43 (DE3)-Zellen angeimpft. Die Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Für die Hauptkultur wurden 500 mL 2YT-Medium in schikanierten 1 L-Flasken verwendet und mit 100 µg mL⁻¹ Ampicillin versetzt. Mit der Vorkultur wurde das Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt. Anschließend wurde der Ansatz bei 30 °C und 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 – 0,9 inkubiert und dann mit 0,5 mM IPTG die Proteinexpression induziert. Diese fand für 5 h bei 30 °C und 180 rpm statt, bevor die Zellen bei 7.500 × g und 4 °C für 15 min pelletiert wurden. Das Zellpellet wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.4.2 Expression des Volllängenproteins ETR2

Das Plasmid pGEX-4T-1_TEV_ETR2_H₁₀ wurde in C43 (DE) Zellen wie unter 2.3.2 beschrieben transformiert. Der Rezeptor ETR2 ist hierbei N-terminal mit der Glutathion-S-Transferase (GST) verknüpft, welche zur Expression benötigt wurde. Zudem wurde C-terminal ein Dekahistidin-Tag zur Reinigung über IMAC an ETR2 fusioniert (vgl. 2.1.8). Die Vorkultur bestehend aus 500 mL 2YT-Medium in 1 L-Glaskolben wurde mit 100 µg mL⁻¹ Ampicillin versetzt und mit einer Kolonie der transformierten C43 (DE3)-Zellen angeimpft. Die Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Für die Hauptkultur wurden 500 mL TB-Medium in schikanierten 1 L-Glaskolben verwendet und mit 100 µg mL⁻¹ Ampicillin und 2 % (v/v) Ethanol versetzt. Die Hauptkultur wurde auf eine OD₆₀₀ von 0,1 aus der Vorkultur angeimpft. Anschließend wurde die Kultur bei 30 °C und 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 inkubiert und die Inkubationstemperatur dann auf 16 °C gesenkt. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 wurde mit 0,5 mM IPTG induziert. Die Genexpression erfolgte für 4 Stunden bei 16 °C und 180 rpm. Die Zellen wurden bei 7.500 × g und 4 °C für 15 min pelletiert. Das Zellpellet wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.4.3 Expression von ETR1-TM

Das Plasmid pET16b_ETR1¹⁻¹⁵⁷C45C65 wurde in C43 (DE) Zellen wie in 2.3.2 beschrieben transformiert. Die Genexpression erfolgte analog zu 2.4.2 mit folgenden Ausnahmen: es wurde 2YT-Medium in der Hauptkultur verwendet und die Genexpression erfolgte über Nacht.

2.4.4 Expression von EIN2-CEND

Die heterologe Expression von EIN2-CEND erfolgte auf Grundlage des Protokolls von Bisson *et al.* [60]. Das Plasmid pET15b(+)_EIN2⁴⁷⁹⁻¹²⁹⁴ wurde in *E. coli* BL21pRARE-Zellen transformiert (vgl. 2.3.2). Die Genexpression erfolgte dann analog zu 2.4.1. mit der Ausnahme, dass der Vorkultur zusätzlich 34 µg mL⁻¹ Chloramphenicol zugefügt wurde.

2.4.5 Expression von CTR1

Das Plasmid pET30(+)_CTR1-CFP wurde in *E. coli* BL21pRARE-Zellen transformiert (vgl. 2.3.2). Die Genexpression erfolgte analog zu 2.4.2 mit folgenden Ausnahmen: die Vorkultur wurde mit $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ Kanamycin und $34 \mu\text{g mL}^{-1}$ Chloramphenicol versetzt, zudem wurde 2YT-Medium mit $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ Kanamycin in der Hauptkultur verwendet und die Genexpression erfolgte über Nacht.

2.5 Proteinpräparation rekombinanter Proteine aus *E. coli*

2.5.1 Zellaufschluss

2.5.1.1 Zellaufschluss mittels Cell Disruption System

Der Zellaufschluss der *E. coli* C43(DE)-Zellen mit den exprimierten Rezeptoren ETR1, ETR2 bzw. von allen ETR1-Mutanten (vgl. 2.4.1, 2.4.2 und 2.4.3) erfolgte an einem Cell Disruption System (Constant Systems, Daventry, England). Hierfür wurden je 1 g Zellen in 5 mL eiskaltem Rezeptor-Aufschlusspuffer resuspendiert und bei 2,4 kbar bei 5°C aufgeschlossen.

Rezeptor-Aufschlusspuffer:

1x PBS pH 8,0; 10 % (w/v) Glycerin; 0,002 % (w/v) PMSF

1x PBS-Puffer:

140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na_2PO_4 ; 1,8 mM KH_2PO_4

2.5.1.2 Zellaufschluss mittels FrenchPress

Die exprimierten Proteine EIN2-CEND und CTR1-CFP (vgl. 2.4.4 und 2.4.5) wurden über Hochdruckhomogenisation aufgeschlossen. Hierfür wurden je 1 g Zellen in 5 mL des jeweiligen eiskaltem Aufschlusspuffers resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels vorgekühlter FrenchPress 40 K Aufschlusszelle bei ca. 20.000 psi (ca. 1,4 kbar) durch einfache Hochdruckhomogenisation.

EIN2-Aufschlusspuffer:

50 mM Tris/HCl pH 7,6; 300 mM NaCl; 6 % (w/v) Glycerin; 5 mM DTT; complete EDTA-free Proteaseinhibitor (Roche AG, Basel, Schweiz)

CTR1-Aufschlusspuffer:

50 mM Hepes/NaOH pH 7,6; 300 mM NaCl; 5 % (w/v) Glycerin; complete EDTA-free Proteaseinhibitor (Roche AG, Basel, Schweiz)

2.5.2 Membranpräparation der in *E. coli* exprimierten Rezeptoren

Die Membranpräparation der in *E. coli* exprimierten Rezeptorproteine erfolgte über differentielle Zentrifugation und diente der Abtrennung von nicht aufgeschlossenen Zellen und *Inclusion bodies*, sowie der Gewinnung von *E. coli*-Membranen mit den exprimierten Rezeptoren (vgl. 2.4.1, 2.4.2 und 2.4.3). Nach erfolgtem Zellaufschluss (vgl. 2.5.1.1) wurde die Zellsuspension für 30 min bei 14.000 × g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde verworfen und der Überstand bei 4 °C für 30 min bei 40.000 × g zentrifugiert. Um an der Membran assoziierte Fremdproteine zu entfernen, wurde das Zellpellet in Rezeptor-Aufschlusspuffer resuspendiert (vgl. 2.5.1.1), die Suspension in 12 mL-Röhrchen aliquotiert und erneut für 30 min bei 4 °C und 34.000 × g zentrifugiert. Die so entstandenen Zellpellets wurde in Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.5.3 Reinigung der in *E. coli* exprimierten Rezeptoren

Zur Reinigung mussten die Rezeptorproteine zunächst aus den präparierten *E. coli*-Membranen gelöst werden (vgl. 2.5.2). Hierfür wurde ein Zellpellet in Solubilisierungspuffer mit einem Pinsel resuspendiert und anschließend bei 4 °C für 1 h bei 700 rpm auf

einem Magnetrührer inkubiert. Nach der Solubilisierung wurden nicht gelöste Proteine und Proteinaggregate durch Ultrazentrifugation bei $230.000 \times g$ und $4^\circ C$ für 30 min abgetrennt.

Anschließend wurde der Überstand auf eine 5 mL HisTrap FF-Säule [1,6 x 2,5 cm] geladen, die vorher in Puffer R äquilibriert wurde. Die Reinigung der Rezeptoren erfolgte bei $4^\circ C$ an einer ÄKTaprime plus (GE Healthcare, München). Hierfür wurde die Säule nach der Probenauftragung zunächst mit 10 Säulenvolumen (SV) Puffer R, danach mit 20 SV Puffer R-ATP, und erneut mit 10 SV Puffer R gewaschen. Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschrift mit 50 mM Imidazol in Puffer R, bevor das Zielprotein mit 250 mM Imidazol in Puffer R von der Säule verdrängt wurde.

Solubilisierungspuffer:

50 mM Tris/HCl pH 7,8; 200 mM NaCl; 1,2 % (w/v) Fos-16; 0,015 % (w/v) PMSF

Puffer R:

50 mM Tris/HCl pH 7,8; 200 mM NaCl; 0,015 % (w/v) Fos-16

Puffer R-ATP:

Puffer R mit: 50 mM KCl; 20 mM MgCl₂; 10 mM ATP

Die Solubilisierung und Reinigung des Rezeptors ETR2 erfolgte unter Zugabe von 2,5 mM DTT in den jeweiligen Puffern.

2.5.4 Reinigung von EIN2-CEND über IMAC

Nach erfolgtem Zellaufschluss (vgl. 2.5.1.2) wurde die Zellsuspension für 2 h bei $230.000 \times g$ und $4^\circ C$ zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 15 mM Imidazol pH 7,6 und 0,002 % (w/v) PMSF versetzt und auf eine 5 mL HisTrap FF-Säule [1,6 x 2,5 cm] geladen, die vorher mit Puffer E äquilibriert wurde. Die Reinigung erfolgte bei $4^\circ C$ an einer ÄKTaprime plus (GE Healthcare, München). Hierfür wurde die Säule nach der Probenauftragung zunächst mit 10 SV Puffer E und danach mit je 10 SV mit 50 mM bzw. 100 mM Imidazol in Puffer E gewaschen. Hierauf folgte die Zugabe von 10 SV Puffer E, 20 SV

Puffer E-ATP und erneut 10 SV Puffer A. Die Elution von EIN2-CEND von der Säule erfolgte mit 500 mM Imidazol in Puffer E.

Puffer E:

50 mM Tris/HCl pH 7,6; 300 mM NaCl; 6 % (w/v) Glycerin; 2,5 mM DTT;
0,002 % (w/v) PMSF

Puffer E-ATP:

Puffer E mit: 50 mM KCl; 20 mM MgCl₂; 10 mM ATP

2.5.4.1 Behandlung von gereinigtem EIN2-CEND mit TEV-Protease

Zur Entfernung des Histidin-Tags von EIN2-CEND wurde das Protein mit TEV-Protease versetzt. Die TEV-Protease schneidet spezifisch innerhalb einer Erkennungssequenz, die sich in dem verwendeten Konstrukt zwischen N-terminalem Histidin-Tag und EIN2-CEND befindet. EIN2-CEND wurde wie zuvor beschrieben zunächst über IMAC gereinigt (vgl. 2.5.4). Anschließend wurde die Proteinkonzentration über Ultrafiltration erhöht und das Protein in Puffer E-TEV überführt. Die Proteinkonzentration wurde bestimmt (vgl. 2.7.1) und TEV-Protease in einem molaren Verhältnis von 75:1 zugesetzt. Der Ansatz wurde für 1 h unter leichtem Schwenken auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Anschließend wurde die TEV-Protease von EIN2-CEND unter Verwendung einer 1 mL HisTrap HP-Säule [0,7 × 2,5 cm] an einer ÄKTAprime plus (GE Healthcare, München) bei 4 °C entfernt. Hierfür wurde die Säule zunächst mit dem Ansatz beladen und anschließend mit 10 SV Puffer E-TEV gewaschen. Die Elution von EIN2-CEND von der Säule erfolgte mit 100 mM Imidazol in Puffer E-TEV.

Puffer E-TEV:

50 mM Tris/HCl pH 7,6; 300 mM NaCl; 5 % (w/v) Glycerin

2.5.5 Reinigung von CTR1-CFP über IMAC

Nach erfolgtem Zellaufschluss (vgl. 2.5.1.2) wurde die Zellsuspension für 1 h bei 230.000 × g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 0,002 % (w/v) PMSF versetzt und auf eine 5 mL HisTrap HP-Säule [1,6 × 2,5 cm] geladen, die vorher mit Puffer C

äquiliert wurde. Die Reinigung erfolgte bei 4 °C an einer ÄKTAprime plus (GE Healthcare, München). Hierfür wurde die Säule nach der Probenauftragung zunächst mit 10 SV Puffer C und danach mit 20 SV Puffer C-ATP gewaschen. Anschließend folgten je 10 SV mit 50 mM bzw. 100 mM Imidazol in Puffer C. Die Elution von CTR1-CFP von der Säule erfolgte mit 500 mM Imidazol in Puffer C.

Puffer C:

50 mM Hepes/NaOH pH 7,6; 300 mM NaCl; 5 % (w/v) Glycerin; 0,002 % (w/v) PMSF

Puffer C-ATP:

Puffer C mit: 50 mM KCl; 20 mM MgCl₂; 10 mM ATP

2.6 Markierung und Reinigung der ETR1_FlAsH-Mutanten

Für die Markierung mit dem Farbstoff FlAsH wurde ein Membranpellet aus der Membranpräparation in Puffer VS resuspendiert (vgl. 2.5.2). Die Proteinkonzentration wurde wie in 2.7.1 beschrieben bestimmt. Die Proteinlösung wurde mit dem Farbstoff FlAsH (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) in einem molaren Verhältnis von Protein zu Farbstoff von 40:1 versetzt und für 4 h bei 4 °C und 700 rpm lichtgeschützt inkubiert. Ab diesem Inkubationsschritt erfolgten alle nachfolgenden Schritte lichtgeschützt.

Anschließend wurde Fos-16 zur Proteinlösung hinzugegeben und die Fos-16-Konzentration hierbei auf 1,2 % (w/v) eingestellt. Die Solubilisierung erfolgte für 1 h bei 4 °C ebenfalls bei 700 rpm. Die anschließende Proteinreinigung der mit FlAsH versetzten Proteine erfolgte wie unter 2.5.3 beschrieben mit drei zusätzlichen Waschschritten vor der Proteinelution. Nach dem Waschen der Säule mit 50 mM Imidazol in Puffer R, wurde erneut mit 10 SV Puffer R gewaschen. Hierauf folgten 20 SV Puffer R mit 5 µM Ethandithiol (Sigma-Aldrich, Mannheim). Die Säule wurde danach mit 10 SV Puffer R gewaschen und das Protein wie zuvor mit 250 mM Imidazol in Puffer R von der Säule verdrängt.

VS-Puffer:

50 mM Tris/HCl pH 8,0; 200 mM NaCl; 5 mM DTT, 5 mM TCEP, 0,002 % (w/v) PMSF

2.7 Proteinbiochemische Methoden

2.7.1 Bestimmung der Proteinkonzentration über UV-Absorption bei 280 nm

Die Proteinkonzentration wurde über die Extinktion bei 280 nm an einem Infinite M200 Pro Plattenlesegerät (Tecan, Männedorf, Schweiz) bestimmt. Es wurden je 2 µL Probe auf eine NanoQuant Platte (Tecan, Männedorf, Schweiz), mit einer Schichtdicke von 0,05 cm, aufgetragen und in Dreifachbestimmung gemessen. Zudem wurde der entsprechende Puffer ebenfalls in Dreifachbestimmung gemessen, um die Konzentrationsbestimmung um das Hintergrundsignal korrigieren zu können. Die Konzentration wurde über das Lambert-Beersche-Gesetz unter Einbezug des Extinktionskoeffizienten des jeweiligen Proteins (vgl. Tab. 2.7) berechnet. Die Extinktionskoeffizienten der einzelnen Proteine wurde mittels ExPASy ProtParam bestimmt [107]

$$E = M * \epsilon * d$$

- E: Extinktion
 M: Proteinkonzentration [mol L⁻¹]
 ε: Extinktionskoeffizient [M⁻¹ cm⁻¹]
 d: Schichtdicke der NanoQuant Platte [0,05 cm]

Tab. 2.7.: Extinktionskoeffizienten (ε) der zur Reinigung eingesetzten Proteine.

| Bezeichnung des Proteins | ε [M ⁻¹ cm ⁻¹] |
|-------------------------------|---------------------------------------|
| ETR1 | 57005 |
| ETR1_FIAsh ⁷⁴⁻⁸⁵ | 56380 |
| ETR1_FIAsh ¹²³⁻¹³² | 56380 |
| ETR1-TM | 24075 |
| ETR2 | 115740 |
| EIN2-CEND | 92710 |
| CTR1-CFP | 126835 |

2.7.2 Spektroskopische Bestimmung der Proteinkonzentration und Markierungseffizienz

Nach Markierung einer Proteinlösung mit dem Farbstoff Alexa488 oder FIAsh wurde die Proteinkonzentration, sowie die Markierungseffizienz der Proteinlösung an einem DU800 Spektralphotometer (Beckmann Coulter, Krefeld) gemessen. Hierfür wurde ein Absorptionsspektrum im Bereich von 270 nm bis 700 nm aufgenommen und die Absorptionsmaxima zur Berechnung ermittelt. Die Proteinkonzentration, sowie die Markierungseffizienz wurden nach den folgenden Formeln berechnet:

$$M = \frac{A_{280} - (A_{\max} * CF)}{\epsilon_P}$$

$$ME = \frac{A_{\max}}{\epsilon_F * M}$$

| | | |
|--------------------|---------------------------------------|---|
| M: | Proteinkonzentration | [mol L ⁻¹] |
| A ₂₈₀ : | Absorptionsmaximum des Proteins | [bei 280 nm] |
| A _{max} : | Absorptionsmaximum des Farbstoffs | [Alexa488: 498 nm; FIAsh: 513 nm] |
| CF: | Korrekturfaktor des Farbstoffs | [Alexa488: 0,11; FIAsh: 0,22] |
| ε _P | Extinktionskoeffizient des Proteins | [M ⁻¹ cm ⁻¹] (vgl. Tab. 2.7) |
| ME: | Markierungseffizienz | [%] |
| ε _F | Extinktionskoeffizient des Farbstoffs | [Alexa488: 71.000 M ⁻¹ cm ⁻¹ [FIAsh: 63.000 M ⁻¹ cm ⁻¹] |

2.7.3 Erhöhung der Proteinkonzentration durch Ultrafiltration

Bei der Ultrafiltration trennt eine semipermeable Membran Moleküle nach ihrer Größe auf. Große Moleküle werden von der Membran zurückgehalten, während kleinere Moleküle, wie beispielsweise Salze oder Wasser, die Membran passieren können. Die hier verwendeten Ultrafiltratoren hatten eine Porengröße von 3 kDa (für ETR1-TM), 30 kDa (für EIN2, ETR1 und ETR1-Mutanten die AS-Substitutionen in der Sequenz des Vollängenproteins enthalten) oder 50 kDa (für ETR2, CTR1-CFP). Die Proteinkonzentrierung erfolgte bei 5.000 × g und wurde bis zur gewünschten Endkonzentration durchgeführt.

2.7.4 Wechsel der Pufferlösung mittels PD-Entsalzungssäulen

Für einige Methoden war es notwendig die verwendeten Proteine in eine andere Pufferlösung zu überführen. Dazu wurde eine PD-10 G-25 Säule oder eine PDminiTrap G-25 Säule (beide GE Healthcare, München) je nach gewünschtem Proben- und Endvolumen verwendet. Die Methode basiert auf dem Trennprinzip der Größenausschlusschromatographie (SEC). Kleine Moleküle dringen in die Säulenmatrix ein und verweilen somit länger in der Säule als größere Moleküle, welche gar nicht oder nur weniger in die Matrix eindringen. Die Säule wurde vor Gebrauch den Herstellerangaben entsprechend mit dem gewünschten Puffer äquilibriert. Ebenso wurden die Volumina der eingesetzten Proteinlösung und der Elutionslösung den Herstellerangaben entsprechend eingesetzt.

2.7.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Analyse von Expressions- und gereinigten Proteinproben erfolgte mittels diskontinuierlicher Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) [modifiziert nach ¹⁰⁸]. In dieser Arbeit wurden 5 %ige (w/v) Sammelgele und 10 %ige (w/v) bzw. 12 %ige (w/v) Trenngele mit einer Größe von 10 × 10 cm und 15 Probestaschen verwendet. Die genaue Zusammensetzung der Gele ist in Tab. 2.8 aufgeführt.

Tab. 2.8.: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Gele. Aufgeführt sind die benötigten Volumina zur Herstellung der verwendeten Sammel- und Trenngele. Die Mengenangaben entsprechen drei Gelen.

| Zusammensetzung | 12 %iges Trenngel V [mL] | 10 %iges Trenngel V [mL] | 5 %iges Sammelgel V [mL] |
|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| H ₂ O | 9,9 | 12,0 | 10,8 |
| 30 % (v/v) Acrylamid mix | 12,0 | 9,9 | 2,7 |
| 1,5 M Tris/HCl pH 8,8 | 7,5 | 7,5 | - |
| 1 M Tris/HCl pH 6,8 | - | - | 2,0 |
| 10 % (w/v) SDS | 0,3 | 0,3 | 0,16 |
| 10 % (w/v) APS | 0,3 | 0,3 | 0,16 |
| TEMED | 0,012 | 0,012 | 0,016 |

Vor dem Beladen der Gele wurden die Proteinproben mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt. Um nach erfolgter Gelelektrophorese den Proteinbanden ein Molekulargewicht zuordnen zu können, wurde ein Größenstandard mit auf das Gel aufgetragen. Für SDS-Gele, welche später mit kolloidalem Coomassie gefärbt wurden, wurde der PageRuler™ Unstained Protein Ladder verwendet. Für SDS-Gele die wiederum in WesternBlots verwendet wurden, wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder verwendet (beide Thermo Fisher Scientific, Schwerte). Die Elektrophorese erfolgte bei 20 mA für 75 min.

4x SDS-Probenpuffer:

20 mM Tris/HCl pH 6,8; 40 % (w/v) Glycerin; 4 % (w/v) SDS; 0,04 % (w/v) Bromphenolblau; 20 % (w/v) β -Mercaptoethanol

10x Elektrodenpuffer:

0,25 M Tris; 1,92 M Glycin; 0,5 % (w/v) SDS

Die Analyse der Expressionsproben erfolgte in Abhängigkeit der jeweiligen optischen Dichte zum Zeitpunkt der Probenentnahme. Dies wurde wie folgt berechnet und in der SDS-PAGE eingesetzt: $5,6/OD_{600}$ entspricht dem aufzutragenden Volumen in μL . Die gereinigten Proteinproben wurden mit einer Masse von $0,5 \mu\text{g} - 5 \mu\text{g}$ in der SDS-PAGE eingesetzt.

2.7.6 Färbung der Polyacrylamidgele mit kolloidalem Coomassie

Diese Methode zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität, einen geringen Zeitaufwand und eine gleichmäßige Farbintensität aus und wurde analog zu dem Protokoll von Dyballa & Metzger durchgeführt [109].

Nach erfolgter SDS-Gelelektrophorese (vgl. 2.7.5) wurde das Gel dreimal für 10 min mit warmem Wasser auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Die Färbung der Proteine erfolgte mit kolloidaler Coomassie-Färbelösung über Nacht. Nach abgeschlossener Färbung wurden die Gele zweimal mit Wasser gewaschen. Die Digitalisierung des Gels erfolgte mittels BioDoc Analyzer (Analytik Jena, Jena)

Kolloidale Coomassie-Färbelösung:

5 % (w/v) $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$; 2 % (w/v) H_3PO_4 ; 10 % (v/v) Ethanol; 0,02 % (w/v) Coomassie G-250

2.7.7 WesternBlot

Die Methode des WesternBlots beruht auf dem Transfer der mittels SDS-Gelelektrophorese getrennten Proteinproben auf eine Membran und späterem immunologischen Nachweis mittels Antikörpern.

Die in dieser Arbeit durchgeführten WesternBlots wurden nach dem *semidry*-Verfahren durchgeführt. Dazu wurde nach erfolgter Gelelektrophorese (vgl. 2.7.5) das SDS-Gel aus dem System entnommen, das Sammelgel entfernt und das Trenngel in Transferpuffer äquilibriert. Für den WesternBlot wurden drei Lagen Filterpapier, getränkt in Transferpuffer auf die Anode der Apparatur aufgebracht. Für den Transfer wurde eine 0,45 µm Nitrocellulosemembran (CTR1-CFP und EIN2-CEND) bzw. eine 0,45 µm PVDF-Membran (alle Rezeptoren) verwendet. Die PVDF-Membran wurde zuvor in Methanol aktiviert und anschließend, wie die Nitrocellulosemembran in Transferpuffer äquilibriert bevor sie auf das Filterpapier gelegt wurde. Hierauf wurde das Trenngel platziert und mit drei weiteren Lagen Filterpapier bedeckt. Anschließend wurde die Apparatur mit der Kathode verschlossen. Der Transfer erfolgte für 75 min bei einer konstanten Stromstärke von 1 mA/cm².

Transferpuffer:

25 mM Tris; 150 mM Glycin; 10 % (v/v) Ethanol

2.7.8 Immunologischer Nachweis

Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran entnommen und zweimal für 15 min mit 5 % Milchpulver-Lösung auf einem Rotationsschüttler inkubiert, um freie Proteinbindestellen abzusättigen. Anschließend wurde die Membran zweimal mit TBT und einmal mit TBS jeweils für 10 min gewaschen. Die Inkubation mit Primärantikörper in der jeweiligen Verdünnung (vgl. 2.1.4) erfolgte in 5 %iger Milchpulverlösung für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Überschüssiger Antikörper wurde durch drei 10-minütige Waschschriffe mit TBT und einmaliges Waschen mit TBS entfernt. Wurde ein Sekundärantikörper benötigt, so wurde die Membran im diesem verdünnt in 5 % Milchpulverlösung (vgl. 2.1.4) für 1 h bei RT inkubiert. Abschließend erfolgten erneut zwei bzw. ein Waschschriffe mit TBT und TBS für 10 min.

Die Detektion erfolgte mittels Meerrettichperoxidase (HRP)-katalysierter Chemielumineszenzreaktion. Die entweder am Primär- oder Sekundärantikörper gekoppelte HRP oxidiert zugegebenes Luminol bei Anwesenheit von Wasserstoffperoxid bei gleichzeitiger Abgabe von Licht, welches mit einem LAS-4000 mini (Fujifilm, Düsseldorf) detektiert wurde. Für diese Reaktion wurde die Membran in Folie eingeschweißt und mit Lumineszenzreagenz überschichtet.

5 % Milchpulverlösung:

5 % (w/v) Milchpulver; 1x TBS-Puffer

TBS-Puffer:

10 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl

TBT-Puffer:

20 mM Tris/HCl pH 8,0; 500 mM NaCl; 0,05 % (v/v) Tween20

2.7.9 Markierung der gereinigten Proteine mit dem Farbstoff Alexa488

Für Interaktionsstudien am Monolith NT.115 (vgl. 2.8.3) wurden fluoreszenzmarkierte Proteine benötigt. Hierfür wurde zunächst die Proteinkonzentration der gereinigten Proteine (vgl. 2.5.3, 2.5.4 und 2.5.5) über Ultrafiltration erhöht (vgl. 2.7.3). Anschließend wurde ein Pufferwechsel in den jeweiligen Markierungspuffer (vgl. Tab. 2.9) über PD-Säulen vorgenommen (vgl. 2.7.4).

Tab. 2.9.: Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen zur Markierung mit dem Amin-reaktiven Farbstoff Alexa488. Aufgeführt ist die Zusammensetzung der verschiedenen Pufferlösungen die zur Markierung von CTR1-CFP, EIN2-CEND und den gereinigten Rezeptoren verwendet wurden.

| Protein | Zusammensetzung |
|---|---|
| CTR1 | 50 mM KP _i pH 8,0; 300 mM NaCl |
| EIN2-CEND | 50 mM KP _i pH 8,0; 300 mM NaCl, 6 % (w/v) Glycerin, 10 mM EGTA/NaOH pH 8,0 |
| Aus <i>E. coli</i> isolierte Rezeptoren | 50 mM KP _i pH 8,0; 300 mM NaCl, 0,015 % (w/v) Fos-16 |

KP_i: 48 mM K₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄ pH 8,0

Die Konzentration der jeweiligen Proteinlösung wurde am Infinite M200 Pro (vgl. 2.7.1) bestimmt. Die Proteinlösung wurde mit 2,5fachen molaren Überschuss an Amin-reaktiven Alexa488 Farbstoff (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) versetzt und für 30 min lichtgeschützt bei RT unter leichtem Schwenken auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Überschüssiger Farbstoff wurde durch einen erneuten Pufferwechsel reduziert (vgl. 2.7.4). Der Puffer wurde hierbei den MST-Messungen angepasst. Hierfür wurde ETR2 in Puffer MST-ETR2 und die Proteine EIN2-CEND, CTR1-CFP, ETR1, sowie ETR1^{H353A} in Puffer F überführt (vgl. 2.8.3). Anschließend wurde die Proteinlösung für 30 min bei 4 °C für 230.000 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und die Proteinkonzentration, sowie die Markierungseffizienz an einem DU800 Spektralphotometer bestimmt (vgl. 2.7.2).

2.8 Proteincharakterisierung

2.8.1 *In vitro* Kinaseaktivitätstest

Die Durchführung des *in vitro* Kinase-Assays erfolgte durch M. Sc. N. Berleth in Kooperation mit dem Institut für Molekulare Medizin I (Universitätsklinikum, Düsseldorf).

Zum Nachweis der Autokinaseaktivitäten von ETR1 und ETR2 wurden *in vitro* Kinase-Assays durchgeführt. Dazu wurden 1 mg der gereinigten Proteine (vgl. 2.5.3) in Kinase-Assay Reaktionspuffer mit 0,1 mM [³²P]ATP (entspricht 10 µCi) für 30 min bei 37°C inkubiert. Der Reaktionspuffer wurde entweder mit 10 mM MnCl₂ oder mit 10 mM Mg(CH₃COO)₂ als Kofaktor versetzt. Zur Denaturierung von ETR2 wurde das Protein vorher mit 40 mM DTT und 2 % (w/v) SDS für 30 min bei 60°C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt und die Proben wurden zur Gelelektrophorese eingesetzt. Nach abgeschlossener Coomassie-Färbung wurden die Gele getrocknet und für 6 Tage zur Autoradiografie eingesetzt.

Reaktionspuffer:

50 mM Tris/HCl pH 7,5; 0,1 mM EGTA; 0,1 mM DTT

2.8.2 Cirkulardichroismus-Spektroskopie

Makromoleküle, wie beispielsweise Proteine, sind meist asymmetrisch aufgebaut und besitzen somit keine Drehspiegelachse. Diese Eigenschaft wird als Chiralität bezeichnet. Chirale Moleküle sind optisch aktiv und lassen sich durch Cirkulardichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) genauer charakterisieren. Dabei wird zirkular polarisiertes Licht, d.h. zwei überlagerte elektromagnetische Wellen mit einer Phasenverschiebung von 90° , verwendet. Dieses Licht wird durch eine Probe geleitet und die Absorption wird gemessen. Optisch aktive Moleküle absorbieren polarisiertes Licht unterschiedlich und weisen folglich zwei verschiedene Extinktionskoeffizienten auf. ϵ_L für den absorbierten Anteil an links zirkular polarisiertem Licht und ϵ_R für den Anteil an rechts zirkular polarisiertem Licht. Die Differenz dieser beider Koeffizienten wird bei verschiedenen Wellenlängen gemessen und so ein CD-Spektrum erhalten. Dabei wird die Absorptionsdifferenz in Elliptizität Θ gemessen und in Milligrad angegeben [^{110,111}].

Die folgende Formel gibt die Berechnung der molaren Elliptizität bezogen auf das mittlere Molekulargewicht der Aminosäurereste und unter Einbeziehung der Proteinkonzentration wieder [¹¹¹].

$$[\Theta]_{MWR} = \Theta * 100 * \frac{\Theta * 100 * MWR}{c * l * n}$$

| | | |
|--------------------|---|--|
| $[\Theta]_{MWR}$: | molare Elliptizität bezogen auf das mittlere Molekulargewicht der Aminosäurereste | [Grad cm ² dmol ⁻¹] |
| Θ : | gemessene Elliptizität | [Grad] |
| M: | molekulare Masse des gemessenen Proteins | [g Da ⁻¹] |
| c: | Konzentration des Proteins | [mg mL ⁻¹] |
| l: | Länge des Strahlenganges | [cm] |
| n: | Anzahl der Aminosäurereste | |

Aus dieser Formel ergeben sich verschiedene CD-Spektren für die in einem Protein vorkommenden Sekundärstrukturen. Die jeweiligen Anteile einzelner Sekundärstrukturelemente einer Probe werden durch Analyseprogramme mit verschiedenen Algorithmen ermittelt. Dabei werden die Messdaten mit bekannten Spektren verglichen [¹¹²].

Zur Aufnahme der CD-Spektren wurden die Ethylenrezeptoren ETR1 und ETR2 über IMAC gereinigt (vgl. 2.5.3), die Proteinkonzentration zunächst erhöht (2.7.3) und anschließend in Puffer CD überführt (vgl. 2.7.4). Die CD-Spektren von ETR1 und ETR2 wurden an einem Jasco 715 Spektralanalysator (Jasco GmbH, Gross-Umstadt) aufgenommen. Die Messungen wurden auf Grundlage von Kessenbrock & Groth durchgeführt [113].

Die Messungen erfolgten in einer 200 μ L Quarzküvette (Hellma, Müllheim) mit einer Schichtdicke von 1 mm. Das Spektrum wurde in 1 nm Abständen mit einer Bandbreite von 1 nm und einer Messgeschwindigkeit von 50 nm min⁻¹ aufgezeichnet. Um ein optimiertes Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten, wurden 10fach Bestimmungen durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt. Zur weiteren Verringerung des Hintergrundrauschens wurde ein Spektrum des verwendeten Puffers aufgenommen und vom jeweiligen Probenspektrum abgezogen.

Puffer CD:

10 mM KP_i pH 8,0

Die Berechnung der Sekundärstrukturanteile erfolgte unter Verwendung des CDPro Programmpakets mit den Programmen CONTINLL, CDSSTR und SELCON3 [114–116].

2.8.3 Microscale Thermophorese

Bei der *Microscale* Thermophorese werden Molekülbewegungen innerhalb eines Temperaturgradienten über Fluoreszenzspektroskopie detektiert. Die Molekülbewegung ist hierbei abhängig von der Größe, Ladung und der Hydrathülle des Moleküls. Wird einer dieser Parameter durch die Bindung eines Interaktionspartner verändert, lässt sich dies über eine Fluoreszenzänderungen detektieren [76,77].

Die Fluoreszenzänderung, die bei der Interaktion zwischen fluoreszenzmarkierten Molekül mit einem Interaktionspartner auftritt, lässt sich anhand der folgenden Gleichung beschreiben [78].

$$F_{norm} = (1 - FB)F_{norm}(unbound) + (FB)F_{norm}(bound)$$

| | |
|-----------------------|---|
| F_{norm} : | normalisierte Fluoreszenz |
| $F_{norm}(unbound)$: | normalisierte Fluoreszenz des markierten Moleküls ohne Ligand |
| $F_{norm}(bound)$: | normalisierte Fluoreszenz des Komplexes |
| FB: | Anteil der gebundenen titrierten Moleküle |

Der Anteil der Moleküle FB, welche am markierten Zielmolekül binden, lässt sich aus der oben aufgeführten Gleichung bestimmen. Die Dissoziationskonstante K_d kann durch Anpassen der Bindungskurve erhalten werden, wobei eine quadratische Gleichung für FB angewandt wird, welche sich aus dem Massenwirkungsgesetz ableitet [78].

$$FB = \frac{[A] + [B] + K_d - \sqrt{([A] + [B] + K_d)^2 - 4[AB]}}{2[B]}$$

| | |
|---------|---|
| FB: | Anteil der gebundenen titrierten Moleküle |
| [B]: | Konzentration des markierten Moleküls |
| [A]: | Konzentration des Liganden |
| K_d : | Dissoziationskonstante |

Fluoreszenzmarkierte Proteine wurden wie in 2.7.9 bzw. 2.8.4 beschrieben vorbereitet und konnten direkt in MST-Messungen verwendet werden.

Proteine die als Titrationspartner eingesetzt wurden, wurden nach der Reinigung in den jeweiligen Messpuffer überführt (vgl. 2.7.4). Hierfür wurde ETR2 in Puffer MST-ETR2 und die Proteine EIN2-CEND, CTR1-CFP, ETR1, ETR1-TM, sowie Mutanten des ETR1-Vollängenproteins in Puffer F überführt. Anschließend wurde die Proteinkonzentration über Ultrafiltration (vgl. 2.7.3) erhöht, die Proteinlösungen bei $230.000 \times g$ für 30 min bei $4^\circ C$ zentrifugiert und die Proteinkonzentration bestimmt (vgl. 2.7.1). Die Interaktionsanalysen erfolgten an einem Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies GmbH, München). Die Interaktionen wurden zunächst mittels MO.Affinity Analysis (NanoTemper Technologies GmbH, München) analysiert und die erhaltenen Messkurven wie in der Einleitung beschrieben angepasst. Die Kurvenanpassung erfolgte mittels QtiPlot (QtiPlot-Data Analysis and Scientific Visualisation, Bukarest, Rumänien) [117]. Die Bedingungen der einzelnen Messungen sind im Anhang 6.3 aufgeführt.

Puffer F:

50 mM Tris/HCl pH 7,8; 300 mM NaCl; 5 % (w/v) Glycerin; 0,0075 % (w/v) Fos-16

MST-ETR2:

50 mM Hepes/NaOH pH 7,8; 300 mM NaCl; 5 % (w/v) Glycerin; 0,0075 % (w/v) Fos-16

2.8.4 Analyse von ETR1_FIAsh-Mutanten über Fluoreszenzspektroskopie

Die Analyse der markierten und gereinigten ETR1_FIAsh-Mutanten erfolgte über Fluoreszenzspektroskopie an einem LS-55 Fluoreszenzspektrometer unter Verwendung der Software FL WinLab™ in einer Semi-Halbmikro Quartz-Küvette (Perkin Elmer GmbH, Rodgau Jügesheim).

Für die Messungen wurden die Proteine ETR1, ETR1_FIAsh⁷⁴⁻⁸⁵ und ETR1_FIAsh¹²³⁻¹³² zunächst mit dem Farbstoff FIAsh markiert und wie unter 2.6 beschrieben über IMAC gereinigt. Anschließend wurde die Proteinkonzentration über Ultrafiltration erhöht (vgl. 2.7.3) und ein Pufferwechsel in Puffer F vorgenommen (vgl. 2.7.4 und 2.8.3). Proteinaggregate wurden über einen Zentrifugationsschritt bei $230.00 \times g$ für 30 min bei $4^\circ C$ abgetrennt und die Proteinkonzentration der jeweiligen Proteinlösung bestimmt (vgl. 2.7.2).

Die Proteine wurden in einer Konzentration von 500 nM am Fluoreszenzspektrometer bei RT gemessen. Die Messungen erfolgten bei einer Detektorstärke von 700 V. Es wurden fünf Messwiederholungen mit einer Messgeschwindigkeit von 100 nm/min akkumuliert. Das Anregungsspektrum wurde im Bereich von 480 – 520 mit einer Emissionswellenlänge von 533 nm aufgenommen. Die Detektion des Emissionsspektrums erfolgte zwischen 526 – 560 nm mit einer Anregung von 515 nm.

2.8.5 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Zur Analyse der Koexpression wurde ein circa 1 cm² großes Quadrat des zu untersuchenden *N. benthamina* Blattes (vgl. 2.3.4) ausgeschnitten. Dieser Blattschnitt wurde mit der adaxialen Seite auf einem Objektträger mit Wasser aufgelegt und mit einem Deckglas mit einer Stärke von 0,17 mm (# 1,5, Thermo Scientific Menzel, Schwerte) bedeckt. Die Bildaufnahmen erfolgten mit einem Zeiss LSM 780 inversen konfokalen Laser Scanning Mikroskop mit einem C-Apochromat 40x/1,20 korr M27 Wasser-Objektiv (Carl Zeiss, Jena). mVenus wurde mit einem Argonlaser bei einer kontinuierlichen Wellenlänge von 488 nm angeregt. Die Emission wurde mit einem 32-Kanal-GaAsP-Detektor bei 508 – 552 nm detektiert. mCherry wurde bei 561 mit einem Diodenlaser unter kontinuierlichen Wellenlänge angeregt und bei 570 – 624 nm detektiert. Zur Bearbeitung der Bilder wurde Fiji (ImageJ) verwendet.

Zur Färbung der Plasmamembran wurde der Farbstoff FM4-64 (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) verwendet. Der Farbstoff wurde in einer Konzentration von 10 µM in ddH₂O angesetzt und 20 min vor der Bildaufnahme mit einer 1 mL Spritze ins zu analysierende Blatt gespritzt. Die Bildaufnahme erfolgte wie zuvor beschrieben, mit folgenden Ausnahmen: die Emission von mVenus wurde zwischen 490 – 552 nm und die Emission des Farbstoffes FM4-64 wurde zwischen 562 – 626 nm aufgenommen. Die Anregung des Farbstoffes erfolgte analog zu mCherry.

2.8.6 *Fluorescence Lifetime Imaging* Mikroskopie (FLIM)

Die Messungen der Fluoreszenzlebenszeit und der Anisotropie erfolgten an einem LSM 780 inversen konfokalen Laser Scanning Mikroskop und einem C-Apochromat 40x/1,20 korr M27 Wasser-Objektiv (Carl Zeiss, Jena). Zusätzlich ist das Mikroskop mit einer 4-Kanal-Einheit zur zeitaufgelösten Einzelphotonenzählung (HydraHarp 400, PicoQuant GmbH, Berlin) ausgestattet.

Die Anregung von mVenus erfolgte mit einem Dioden-Pulslaser (LDH-D-C 485, PicoQuant GmbH, Berlin) bei einer Wellenlänge von 485 nm und einer Pulsrate von 32 MHz. Die Laserstärke wurde vor den FLIM-Messungen am Objektiv mit einem Laser Powermeter (FieldMax II-TO, Coherent Europe B.V., Niederlande) gemessen und auf 1 μ W eingestellt. Die Gesamtfluoreszenz wird beim Verlassen des Scankopfes zunächst mit Hilfe eines Strahlteilers („Polarization Extension Unit“, PicoQuant GmbH, Berlin) nach ihrer Polarisation aufgetrennt und paralleles und senkrechtes Signal werden über polarisationserhaltende Fasern in zwei Detektionsboxen mit jeweils zwei Einzelphotonenempfindlichen Avalanche-Dioden (Tau-SPAD, PicoQuant GmbH, Berlin) nach ihrem Emissionsspektrum getrennt detektiert. Die Emission von mVenus wurde unter Verwendung eines Emissionsfilters mit einer Wellenlänge von 534 nm und einer Bandbreite von 30 nm (AHF Analystechnik GmbH, Tübingen) aufgenommen. Die Anregung von mCherry erfolgte mit dem internen Diodenlaser des Zeiss Systems im Dauerstrichbetrieb („continuous wave laser“) bei 561 nm und einer Laserintensität von 0,1 %. Die Detektion erfolgte ebenfalls mit Einzelphotonenempfindlichen Avalanche-Dioden (Tau-SPAD, PicoQuant GmbH, Berlin). Die Fluoreszenzemission wurde hierbei auf 607 nm und einer Bandbreite von 70 nm, durch Verwendung eines Bandpassfilters (AHF Analystechnik GmbH, Tübingen), begrenzt.

Die Messungen wurden mit einer Bildgröße von 256 \times 256 Pixel und einer Laserweildauer von 12,61 μ s („pixel dwell time“) aufgenommen. Die Aufnahmen erfolgten mit einer Auflösung von 210 nm/Pixel. Zur Detektion von mVenus wurde der Pixelbereich 80mal, für mCherry 10mal gemessen und das Signal pro Pixel aufakkumuliert. Zur Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz wurde vor Beginn der Messung eine Wasser-Kontrolle für 2 min gemessen. Außerdem war es notwendig die instrumentenabhängige Messverzögerung (IRF, *instrument response function*) zu ermitteln und diese in der

späteren Auswertung zu berücksichtigen [118]. Dazu wurde Erythrosin B gelöst in einer gesättigten Kalium-Jodid Lösung aufgrund seiner sehr kurzen Lebenszeit als Referenz verwendet [119].

Die Analyse der Fluoreszenzintensitäten von mVenus und mCherry, sowie der Fluoreszenzlebenszeit von mVenus erfolgte mittels SymphoTime 64 (PicoQuant GmbH, Berlin). Die FLIM-Analyse erfolgte hierbei unter exponentieller Anpassung (*n-exponential Reconvolution*) mit einem Parameter ($n=1$) für mVenus oder ERS2-mVenus und mit zwei Parametern ($n=2$) für Messungen der Kombinationen von ERS2-mVenus mit ERS1-mCherry bzw. BT12-mCherry, sowie ERS2-mVenus-mCherry.

Die Berechnung der FRET-Effizienz (E_{FRET}) erfolgte aus den gemessenen Lebenszeiten anhand folgender Formel [90]:

$$E_{\text{FRET}} = 1 - \frac{\tau_{\text{DA}}}{\tau_{\text{D}}}$$

E_{FRET} : FRET-Effizienz [%]

τ_{DA} : gemessene Lebenszeit des Donor-Akzeptor-Paares [ns]

τ_{D} : gemessene Lebenszeit des Donors in Abwesenheit des Akzeptors [ns]

Die Anisotropie lässt sich über folgende Gleichung bestimmen [120]:

$$r = \frac{I_{\text{VV}} - GI_{\text{VH}}}{I_{\text{VV}} + 2GI_{\text{VH}}}$$

r : Anisotropie

I_{VV} : vertikal angeregte und vertikal emittierte Fluoreszenz

I_{VH} : vertikal angeregte und horizontal emittierte Fluoreszenz

G : G-Faktor

Die Anisotropie wurde mittels SymphoTime 64 (PicoQuant GmbH, Berlin) ausgewertet. Mit dem G-Faktor wird die orientierungsabhängige Sensitivität des Detektors korrigiert. Dieser Faktor wurde über die Messung von Rhodamine110 bestimmt und bei der Auswertung berücksichtigt.

Die statistischen Auswertungen erfolgten mittels ungepaartem t-Test mit Welch-Korrektur oder mittels Mann-Whitney-Test unter Verwendung von GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

2.9 Datenbanken und Computerprogramme

Datenbanken

- EMBOSS (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/>) [¹²¹]
- ExPASy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) [¹⁰⁷]
- Protter (<http://wlab.ethz.ch/protter/start/>) [¹²²]
- UniProt (<https://www.uniprot.org>) [¹²³]

Computerprogramme

- Adobe Photoshop CS3 (Version 10.0, Adobe Systems Inc., San José, CA, USA)
- CorelDRAW Graphics Suite X7 (Version 17.2.0.688, Corel Corporation, Ottawa, Kanada)
- ImageJ/Fiji (Version 1.0, <https://imagej.net/Fiji#Downloads>) [¹²⁴]
- FL WinLab™ (Version 4.00.02, PerkinElmer GmbH, Rodgau Jügesheim)
- GraphPad Prism (Version 7.01, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA)
- Mendeley (Version 1.19.1, Elsevier (Mendeley Ltd.), London, UK)
- Microsoft Office 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA)
- MO.Affinity Analysis (Version 2.1.5, NanoTemper Technologies GmbH, München)
- QtiPlot (Version 0.9.8.9, QtiPlot-Data Analysis and Scientific Visualisation, Bukarest, Rumänien)
- SymphoTime 64 (Version 2.3, PicoQuant GmbH Berlin)

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die funktionelle und strukturelle Charakterisierung von Typ-II Ethylenrezeptoren aus *Arabidopsis thaliana*. Hierbei sollten durch Vergleich mit dem bereits hinlänglich charakterisierten Typ-I Rezeptor ETR1 etwaige Gemeinsamkeiten und Unterschiede analysiert werden. Mit ETR1 als Prototyp der Ethylenrezeptorfamilie konnten in früheren *in vitro* und *in vivo* Studien Interaktionen mit nachgeschalteten Komponenten des Ethylensignalweges nachgewiesen werden [49,72,73,125]. Diese Interaktionsstudien dienten als Grundlage für die in dieser Arbeit durchgeführten Studien des Typ-II Ethylenrezeptors ETR2.

Im Vorfeld dieser Arbeit war weder die Expression, noch die Reinigung von ETR2 in ausreichender Quantität bzw. Qualität gegeben. Daher wurden in dieser Arbeit zunächst die Expression und Reinigung von ETR2 für die Verwendung in späteren Interaktionsstudien etabliert. Die funktionelle Faltung des Rezeptors wurde im weiteren Verlauf über CD-spektroskopische Untersuchungen und die Analyse der Autokinaseaktivität nachgewiesen.

In früheren Studien konnten bereits Interaktionen zwischen dem Typ-II Rezeptor ETR2 und nachfolgenden Komponenten des Signalweges nachgewiesen werden. Jedoch, mit Ausnahme der in dieser Arbeitsgruppe ermittelten FRET-Effizienz der ETR2 – EIN2-Interaktion [126], ermöglichten die verwendeten Methoden wie genetische Analysen, *yeast two-hybrid* Studien oder Pulldown-Experimente jedoch keine Quantifizierung der Interaktionen [41,46,127–129]. Des Weiteren wurden mögliche homo- und heteromere Interaktionen der Rezeptoren untereinander bisher ebenfalls noch nicht quantifiziert. Die Charakterisierung der Affinitäten dieser Protein-Protein-Interaktionen erfolgte in dieser Arbeit mittels *Microscale* Thermophorese. Um die Interaktionen des Typ-II Rezeptors in direkte Relation zu denen des Typ-I Rezeptors setzen zu können, wurden außerdem Bindungskonstanten für den Typ-I Rezeptor ETR1 bestimmt. Hiermit wurde zusätzlich die Verlässlichkeit der Methode anhand der bereits quantifizierten ETR1 – EIN2 Interaktion überprüft [73].

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde außerdem eine mögliche Beteiligung der Rezeptor Transmembrandomäne und der Einfluss der Rezeptorphosphorylierung auf das Interaktionsverhalten der Rezeptoren analysiert. Um den Rezeptor ETR1 positionsspezifisch mit dem Farbstoff FIAsh zu markieren, wurde zunächst über Mutagenese-PCR das benötigte Tetracysteinmotiv in bzw. direkt nach der Transmembrandomäne eingebracht. Die Markierung des Rezeptors wurde mittels Fluoreszenzspektroskopie und die Funktionalität des Rezeptors über MST-Messungen überprüft.

Für die durchgeführten Interaktionsstudien war es notwendig die zu analysierenden Proteine in hoher Reinheit zu verwenden, um mögliche Beeinflussungen durch Fremdproteine ausschließen zu können. Hierfür wurden zunächst die Reinigungen der Proteine ETR1, EIN2 und CTR1 optimiert.

In dieser Arbeit erfolgte darüber hinaus eine Charakterisierung der homo- und heteromeren Rezeptorinteraktionen *in planta*. In früheren Studien konnte eine Lokalisation der Rezeptoren an der ER-Membran gezeigt werden [43,128]. Diese Lokalisation wurde im Verlauf dieser Arbeit zunächst verifiziert und im weiteren Verlauf die Interaktion zwischen einem Typ-I Rezeptor und einem Typ-II Rezeptor durch FLIM-Messungen quantifiziert.

3.1 Molekulare Charakterisierung der Ethylenrezeptoren ETR1 und ETR2

3.1.1 Reinigung des Typ-I Rezeptors ETR1 über IMAC

Für die Verwendung in Interaktionsstudien wurde ETR1 heterolog in *E. coli* exprimiert (vgl. 2.4.1) und unter nativen Bedingungen gereinigt. Hierfür wurde das Protein unter Zugabe des Detergenz Fos-16 aus den *E. coli*-Membranen gelöst und über IMAC gereinigt (vgl. 2.5.3). Zur Überprüfung des Reinheitsgrades wurde das Protein mittels SDS-PAGE (vgl. 2.7.5) aufgetrennt und entweder mit kolloidalem Coomassie gefärbt (vgl. 2.7.6) oder durch einen immunologischen Nachweis detektiert (vgl. 2.7.7 und 2.7.8).

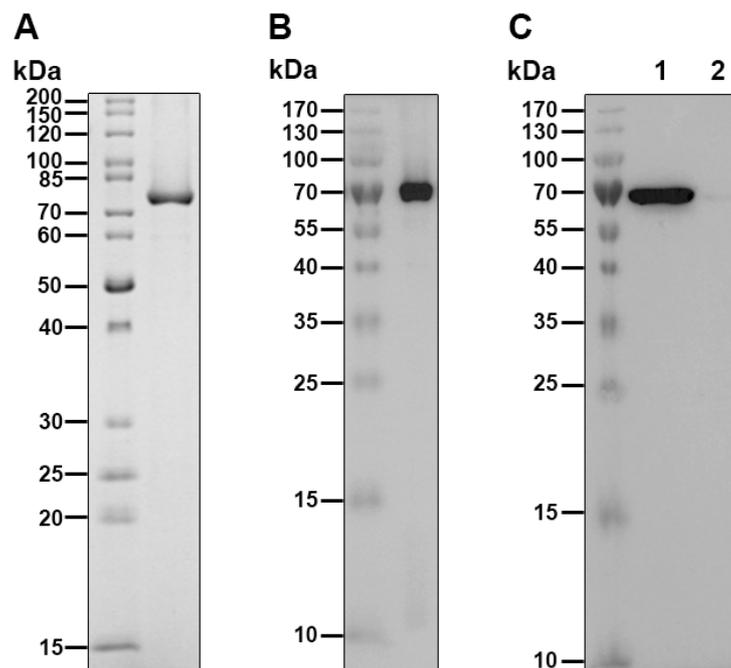


Abb. 3.1.: SDS-PAGE des gereinigten Proteins ETR1. Nativ gereinigtes ETR1 wurde mit kolloidalem Coomassie angefärbt (A). Immunologischer Nachweis des gereinigten ETR1 durch Detektion mit einem Anti-His-HRP Antikörper (B). Der Anti-DnaK Antikörper diente zum Nachweis einer DnaK-Kontamination. In Spur 1 wurde eine ETR1-Probe vor der Reinigung, in Spur 2 nach der IMAC-Reinigung aufgetragen (C). Es wurden jeweils 2 μg (A, C Spur 2), 1 μg (B) oder 5 μL (C, spur 1) der jeweiligen ETR1-Probe auf einem 12 % Trenngel aufgetragen. Zum Abschätzen des Molekulargewichtes wurde ein Größenstandard verwendet.

In Abb. 3.1 (A) wurde das gereinigte Protein ETR1 durch ein SDS-Gel mit anschließender Coomassie-Färbung analysiert. Hierbei ist eine deutlich sichtbare Proteinbande mit hoher Reinheit oberhalb von 70 kDa zu erkennen. Andere Proteinbanden wurden auf dem Gel

nicht detektiert. Der immunologische Nachweis mit dem Anti-His-HRP Antikörper zeigt ebenfalls nur eine Proteinbande bei ca. 70 kDa, welche dem His-markierten ETR1 mit einem theoretischen Molekulargewicht von 85 kDa entspricht (B). Die zusätzliche Analyse mit einem Anti-DnaK-Antikörper wurde durchgeführt, um Verunreinigen mit dem Hitzeschockprotein DnaK nachzuweisen. Eine Verunreinigung mit diesem ist vor der Reinigung von ETR1 zu sehen (C, Spur 1), diese konnte nach der Reinigung jedoch nicht mehr detektiert werden (C, Spur 2).

3.1.2 Heterologe Expression des Typ-II Rezeptors ETR2

Das Protein ETR2 wurde als GST-Fusionsprotein (vgl. 2.1.8), wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben, in C43(DE3)-Zellen exprimiert. Die Proben der Expression wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (vgl. 2.7.5) und immunologisch über einen Anti-His-Antikörper nachgewiesen (vgl. 2.7.7 und 2.7.8).

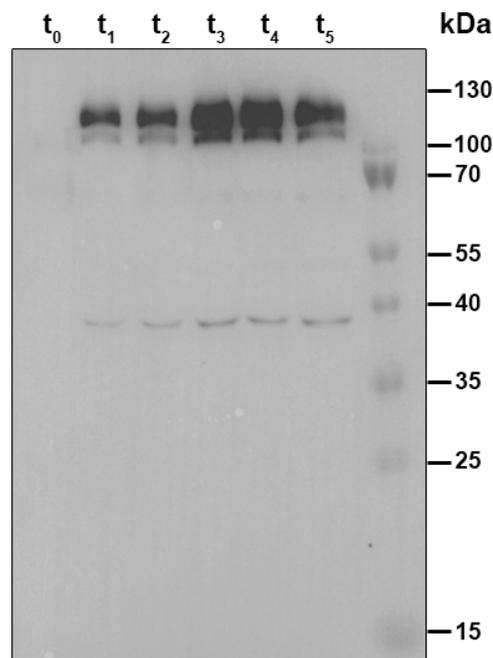


Abb. 3.2.: Expression des Proteins ETR2 in *E. coli* C43 (DE)-Zellen. Es wurden Proben der Expression zum Zeitpunkt der Induktion (t_0), sowie stündlich eine (t_1), zwei (t_2), drei (t_3), vier (t_4) und fünf (t_5) Stunden nach der Induktion entnommen. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und immunologischem Nachweis durch einen Anti-His-Antikörper. Es wurde ein 12 % Trenngel verwendet. Zur Abschätzung des Molekulargewichtes wurde ein Größenstandard verwendet.

Wie in Abb. 3.2 (Spur 1) dargestellt, ist bereits eine Stunde nach Induktion eine deutliche Proteinbande zwischen 100 und 130 kDa zu erkennen. Diese Proteinbande nimmt bis 4 Stunden (4) nach Induktion an Stärke zu, wird ab 5 Stunden (Spur 5) nach Induktion jedoch wieder schwächer. Diese Banden können dem Protein ETR2 mit einem theoretischen Molekulargewicht von 114 kDa zugeordnet werden. Zusätzlich sind zwei weitere schwache Banden zu erkennen. Eine schwache Bande direkt unterhalb der hauptsächlichen Proteinbande, welche durch den immunologischen Nachweis ebenfalls ETR2 zugeordnet wurde. Bei der zweiten schwachen Bande bei ca. 40 kDa, könnte es sich auf Grund des niedrigeren Molekulargewichtes um ein Abbauprodukt von ETR2 oder unvollständig translatiertes Protein handeln.

3.1.3 Reinigung des Typ-II Rezeptors ETR2 über IMAC

Das Protein ETR2 wurde, wie unter 2.4.2 beschrieben, heterolog in *E. coli* exprimiert. Für die Reinigung wurde das Protein aus den *E. coli*-Membranen durch Zugabe des Detergenz Fos-16 gelöst und über IMAC gereinigt (vgl. 2.5.3). Die Reinheit des Proteins wurde durch eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung (vgl. 2.7.5 und 2.7.6) und durch immunologischen Nachweis unter Verwendung eines Anti-His-HRP Antikörpers untersucht (vgl. 2.7.7 und 2.7.8).

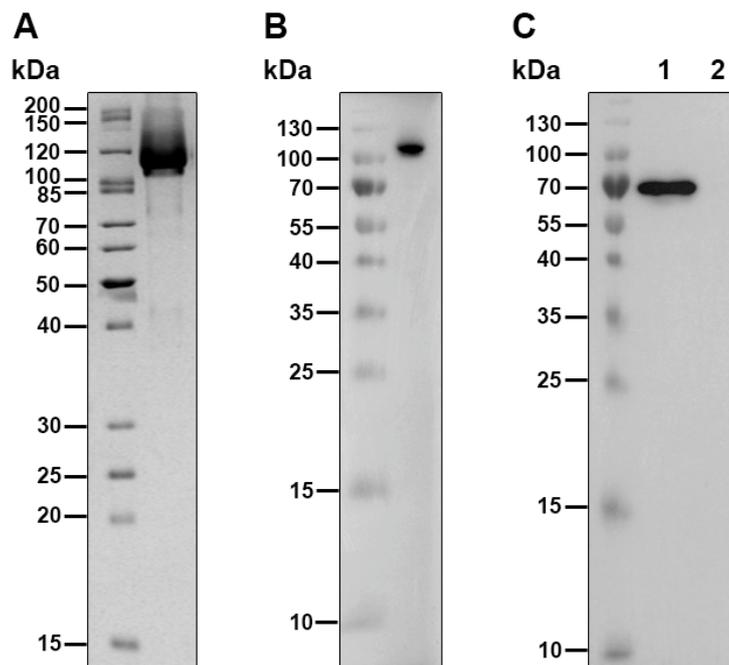


Abb. 3.3.: SDS-Gel des gereinigten Proteins ETR2. Coomassie gefärbtes SDS-Gel von nativ gereinigtem ETR2 (A). Immunologischer Nachweis des gereinigten ETR2 durch Detektion mit einem Anti-His-HRP Antikörper (B). Der Anti-DnaK Antikörper wurde zum Nachweis einer DnaK-Kontamination eingesetzt. In Spur 1 wurde eine ETR2-Probe vor der Reinigung, in Spur 2 nach der IMAC-Reinigung aufgetragen (C). Es wurden jeweils 2 μg (A, C Spur 2), 0,5 μg (B) oder 5 μL (C, Spur 1) der ETR2-Probe auf einem 12 % Trenngel aufgetragen. Zum Abschätzen des Molekulargewichtes wurde ein Größenstandard verwendet.

Das gereinigte Protein ETR2 wurde durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassie Färbung analysiert. Wie durch Abb. 3.3 (A) erkennbar, ist eine deutliche Proteinbande unterhalb von 120 kDa vorhanden. Zusätzlich ist eine sehr schwache Bande direkt unterhalb dieser zu erkennen. Der immunologische Nachweis des Histidin-Tags von ETR2 zeigt eine Proteinbande bei ca. 120 kDa. Diese kann dem Protein ETR2 mit einem theoretischen

Molekulargewicht von 113,5 kDa zugeordnet werden. Eine Kontamination mit dem Hitzeschockprotein DnaK konnte vor der Reinigung nachgewiesen werden (C, Spur 1). Nach erfolgter Reinigung über IMAC war diese Kontamination jedoch nicht mehr detektierbar (C, Spur 2).

3.1.4 Cirkulardichroismus-Spektroskopie von ETR1 und ETR2 zur Untersuchung der Sekundärstruktur

Die Sekundärstruktur eines Proteins lässt sich durch Cirkulardichroismus(CD)-Spektroskopie untersuchen. Dies geschieht durch Berechnung der Sekundärstrukturelemente des gereinigten Proteins und dem Vergleich der *ab initio* Vorhersage. Der Gehalt der Sekundärstrukturanteile kann wiederum einen Hinweis auf eine korrekte Faltung eines Proteins liefern.

3.1.4.1 Bestimmung der Sekundärstrukturanteile von ETR1 über CD-Spektroskopie

Zur Bestimmung der ETR1-Sekundärstrukturanteile wurde das Protein ETR1 zunächst, wie in Kapitel 2.5.3 aufgeführt, gereinigt. ETR1 wurde mit einer Konzentration von $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ mit den in Kapitel 2.8.2 aufgeführten Einstellungen an einem CD-Spektrometer gemessen.

Das gemessene CD-Spektrum von ETR1 ist in Abb. 3.4 dargestellt. Deutlich erkennbar ist ein absolutes Minimum bei 208 nm und ein relatives Minimum bei 221 nm. Der Nulldurchgang liegt bei 201 nm. Aus dem experimentell gemessenen Spektrum wurde eine Sekundärstrukturanalyse mit den Programmen CONTINLL [¹¹⁴], CDSSTR [¹¹⁵] und SELCON3 [¹¹⁶] durchgeführt. Die dadurch vorhergesagten Spektren sind ebenfalls in Abb. 3.4 überlagert dargestellt.

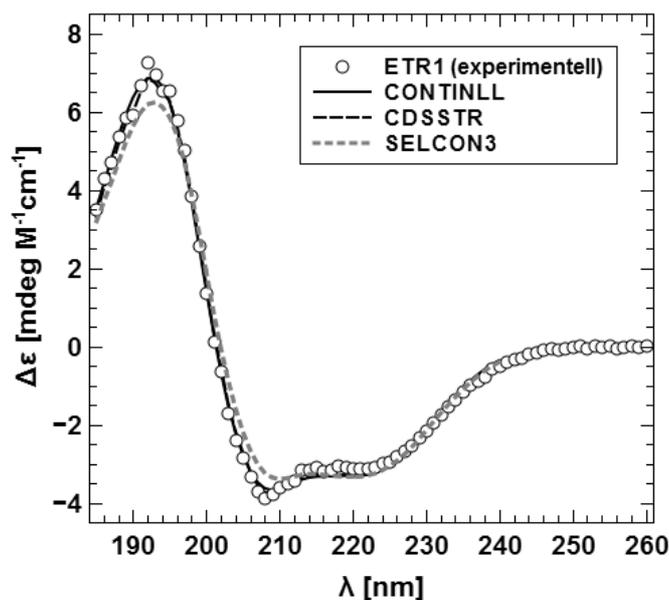


Abb. 3.4.: Cirkulardichroismus-Spektrum von ETR1. Die Aufnahme der 10 Spektren erfolgte mit einer Auflösung von 1 nm und einer Geschwindigkeit von 50 nm min⁻¹. Die Daten wurden gemittelt und um das Molekulargewicht und die Proteinkonzentration von ETR1 korrigiert und als molare Elliptizität dargestellt. Die Vorhersage erfolgte mit den Programmen CONTINLL, CDSSTR und SELCON3.

Alle drei Strukturvorhersagen weichen kaum vom gemessenen Spektrum ab. Eine geringe Abweichung ist bei Verwendung von SELCON3 feststellbar. Alle drei Programme berechnen für ETR1 einen α -helikalen Anteil von ca. 40 % an. Die zum Vergleich durchgeführte sequenzbasierte Vorhersage über das Programm SOPMA gibt einen vergleichbaren Anteil an. Im Gegensatz hierzu zeigt die Vorhersage über SOPMA für den β -Turn Anteil einen um etwa die Hälfte niedrigeren Gehalt an (vgl. Tab. 3.1).

Tab. 3.1.: Vorhersage der Sekundärstrukturanteile von ETR1. Die Berechnung der Sekundärstrukturanteile erfolgte anhand des CD-Spektrums über das Programmpaket von CDpro. Die sequenzbasierte Vorhersage des Programms SOPMA dient als Vergleich.

| Programm | α -Helix [%] | β -Strand [%] | β -Turn [%] | Coil [%] |
|----------|---------------------|---------------------|-------------------|----------|
| CDSSTR | 42 | 14 | 19 | 24 |
| CONTINLL | 40 | 13 | 21 | 27 |
| SELCON3 | 36 | 16 | 22 | 27 |
| SOPMA | 40 | 23 | 8 | 29 |

3.1.4.2 Bestimmung der Sekundärstrukturanteile von ETR2 über CD-Spektroskopie

Das Protein ETR2 wurde wie in Kapitel 2.5.3 aufgeführt gereinigt. Das CD-Spektrum wurde analog zu dem von ETR1 aufgenommen (vgl. 2.8.2)

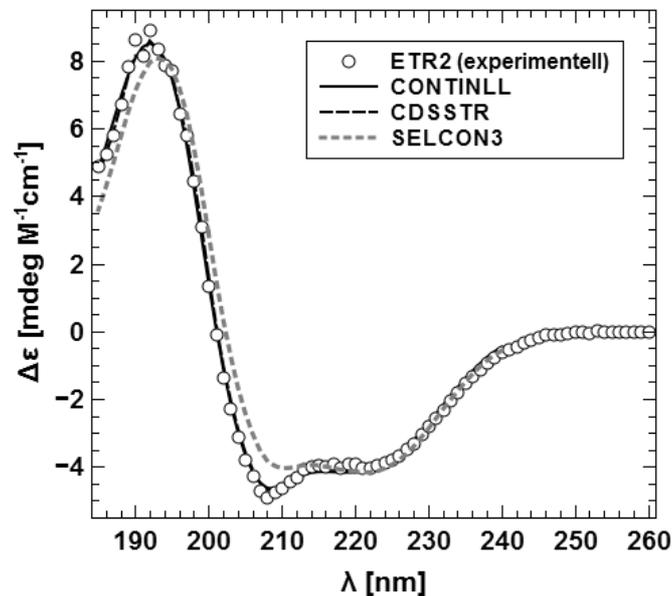


Abb. 3.5.: Cirkulardichroismus-Spektrum von ETR2. Für die Aufnahme des CD-Spektrums wurden 10 Spektren mit einer Auflösung von 1 nm und einer Geschwindigkeit von 50 nm min⁻¹ gemessen. Die gemittelten Daten wurden um das Molekulargewicht und die Proteinkonzentration von ETR2 korrigiert und als molare Elliptizität aufgeführt. Die Vorhersage erfolgte mit den Programmen CONTINLL, CDSSTR und SELCON3.

Das gemessene CD-Spektrum von ETR2 ist in Abb. 3.5 dargestellt. Das Spektrum weist zwei Minima auf, ein absolutes bei 208 nm und ein relatives bei 221 nm. Der Nulldurchgang liegt bei 201 nm. Zusätzlich sind die berechneten Spektren des CDpro Programmpakets dargestellt. Eine geringe Abweichung ist hierbei für die Vorhersage mit SELCON3 erkennbar, während die Vorhersagen durch CONTINLL und CDSSTR nicht vom gemessenen Spektrum abzuweichen scheinen. Die berechneten und durch *ab initio* vorhergesagten Sekundärstrukturanteile sind in Tab. 3.2 aufgeführt.

Tab. 3.2.: Vorhersage der Sekundärstrukturanteile von ETR2. Die Sekundärstrukturanteile von ETR2 wurden anhand des CD-Spektrums über das Programmpaket von CDpro berechnet und mit der sequenzbasierten Vorhersage des Programms SOPMA verglichen.

| Algorithmus | α -Helix [%] | β -Strand [%] | β -Turn [%] | Coil [%] |
|-------------|---------------------|---------------------|-------------------|----------|
| CDSSTR | 50 | 10 | 18 | 22 |
| CONTINLL | 48 | 9 | 18 | 25 |
| SELCON3 | 48 | 12 | 19 | 22 |
| SOPMA | 48 | 14 | 5 | 33 |

Die berechneten Strukturvorhersagen für den α -helikalen und β -Strand Anteil stimmen weitestgehend mit der sequenzbasierten Vorhersage durch SOPMA überein. Eine größere Abweichung der durch SOPMA berechneten Ergebnisse, lag für den β -Turn Anteil vor (vgl. Tab. 3.2).

3.1.5 *In vitro* Kinase-Assay zur Analyse der Autophosphorylierungsaktivität

Um nach den durchgeführten Reinigungen von ETR1 und ETR2 Rückschlüsse auf die Aktivität der Proteine ziehen zu können, wurden diese für *in vitro* Kinase-Assays verwendet. Dabei wurden die einzelnen Proteine in einem mit [³²P]-ATP versetzten Reaktionspuffer inkubiert und nachfolgend mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung detektiert. Die Autophosphorylierung wurde nach 6 Tagen mittels Autoradiografie analysiert. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen dargestellt.

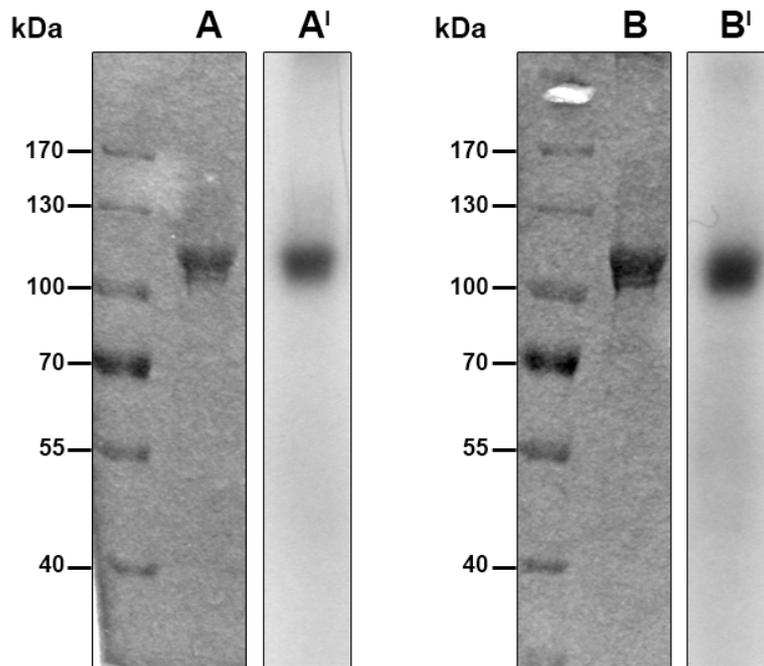


Abb. 3.6.: Nachweis der Autokinaseaktivität von gereinigtem ETR2 durch *in vitro* Kinase-Assay.

Die Autophosphorylierungsreaktion wurde mit 1 mg gereinigtem ETR2 in Mn^{2+} (A und A') oder Mg^{2+} (B und B')-haltigem Reaktionspuffer versetzt mit $[^{32}P]$ -ATP durchgeführt. Die Detektion der eingesetzten Proteine erfolgte durch SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung (A und B). Die getrockneten Gele wurden nach 6 Tagen zur Analyse mittels Autoradiografie verwendet (A' und B').

In Abb. 3.6 wurde ETR2 jeweils in einem Mn^{2+} (A und A') oder einem Mg^{2+} (B und B')-haltigem Reaktionspuffer verwendet. Der Kinase-Assay wurde mit diesen zweiwertigen Kationen durchgeführt, da frühere Studien gezeigt haben, dass Mn^{2+} und Mg^{2+} essentiell für die Autokinaseaktivität der Rezeptoren sind [47]. Durch die Coomassie-Färbung ließ sich das eingesetzte ETR2 durch eine Bande über 100 kDa identifizieren (A und B). Die Autoradiografie zeigt deutliche Signale auf einer Höhe, welche der von ETR2 entsprochen hat (A' und B'). Somit zeigt ETR2 sowohl bei Anwesenheit von Mn^{2+} als auch von Mg^{2+} Autokinaseaktivität. Dabei wirkte das Autoradiografie-Signal bei Verwendung des Mg^{2+} -Puffers etwas stärker, allerdings schien hier auch die Menge von ETR2 leicht erhöht.

ETR2 wurde während der Reinigung über IMAC mit ATP inkubiert, um DnaK-Kontaminationen zu entfernen (vgl. 2.5.3). Um zu analysieren, ob dies einen Einfluss auf die Autokinaseaktivität von ETR2 hat, wurde die Reinigung ohne ATP durchgeführt und das

Protein erneut im *in vitro* Kinase-Assay mit Mg^{2+} -Puffer verwendet. Zusätzlich wurde eine Probe dieser Reinigung vor der Verwendung durch SDS und DTT denaturiert (vgl. Abb. 3.7 A und B).

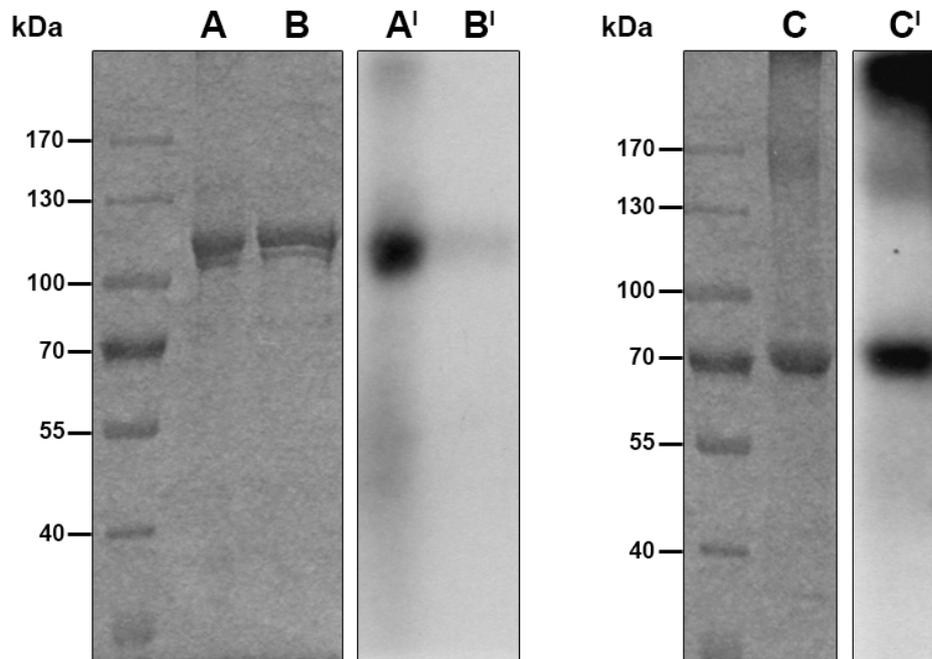


Abb. 3.7.: Nachweis der Autokinaseaktivität der Proteine ETR1 und ETR2 durch *in vitro* Kinase-Assay. Alle Autophosphorylierungsreaktionen wurden in Mg^{2+} -haltigem Reaktionspuffer versetzt mit $[^{32}P]$ -ATP durchgeführt. 1 mg ohne ATP gereinigtes ETR2 wurde direkt (A und A') oder nach vorheriger Denaturierung durch SDS und DTT (B und B') für die Autophosphorylierungsreaktionen verwendet. Zusätzlich wurde 1 mg gereinigtes ETR1 verwendet (C und C'). Die Detektion der verwendeten Proteine erfolgte durch SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung (A, B und C). Die getrockneten Gele wurden nach 6 Tagen zur Analyse mittels Autoradiografie verwendet (A', B' und C').

Anhand der Coomassie-Färbung konnte in beiden Proben ETR2 nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.7 A und B). Das ohne ATP gereinigte ETR2 zeigte ein Autoradiografie-Signal (A'), während die denaturierte Probe eine fast komplette Reduktion des Autoradiografie-Signals aufwies (B'). Letztendlich erfolgte für ETR1 ebenfalls eine Aktivitätsbestimmung mittels *in vitro* Kinase-Assay. Auch hier konnte bei Verwendung eines Mg^{2+} -Puffers dem gereinigten Protein (C) ein deutlich sichtbares Autoradiografie-Signal zugeordnet werden (C').

3.2 Interaktionsanalyse der Rezeptoren mit nachfolgenden Komponenten des Ethylensignalweges

3.2.1 Reinigung von EIN2-CEND über IMAC

Für die nachfolgende Verwendung in Interaktionsstudien wurde die C-terminale Domäne von EIN2 (EIN2-CEND) heterolog in *E. coli* exprimiert (vgl. 2.4.4) und mittels fusioniertem Histidin-Tag über IMAC gereinigt (vgl. 2.5.4). Zur Überprüfung des Reinheitsgrades wurde das Protein mittels SDS-PAGE (vgl. 2.7.5) aufgetrennt und entweder mit kolloidalem Coomassie gefärbt (vgl. 2.7.6) oder durch einen immunologischen Nachweis detektiert (vgl. 2.7.7 und 2.7.8).

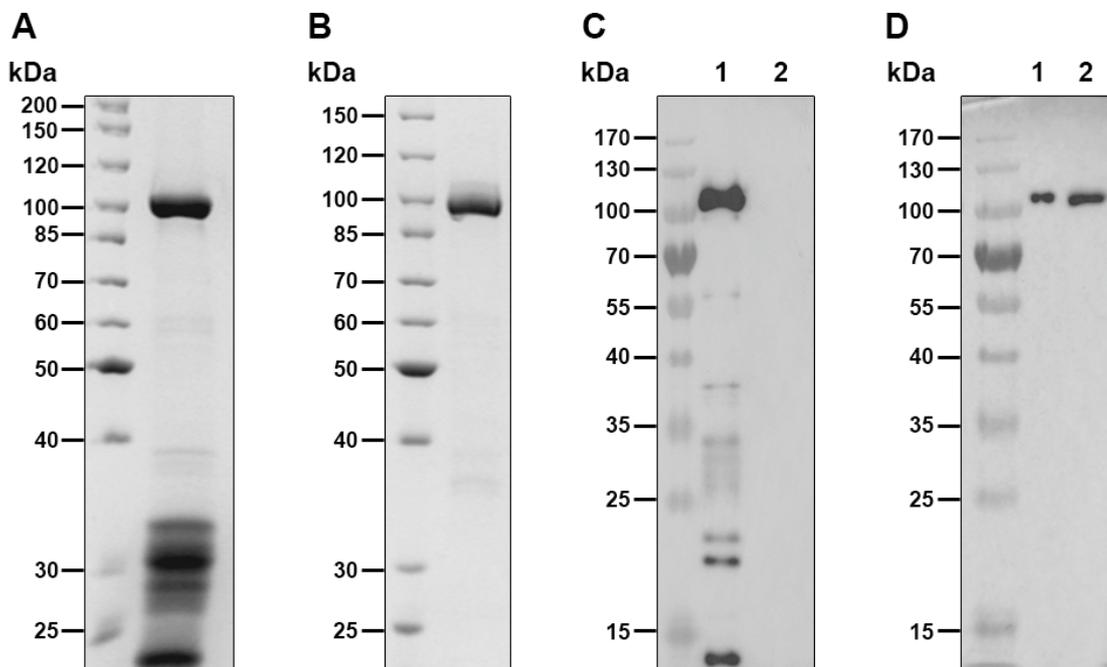


Abb. 3.8.: SDS-PAGE des gereinigten Proteins EIN2-CEND. Gereinigtes EIN2-CEND wurde direkt nach der Reinigung (A) oder nach zusätzlicher Behandlung mit TEV-Protease (B) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit kolloidalem Coomassie angefärbt. Immunologischer Nachweis des gereinigten EIN2-CEND durch Detektion mit einem Anti-His-HRP Antikörper (C) oder mit einem Anti-EIN2 Antikörper (D) jeweils vor (Spur 1) und nach TEV-Behandlung (Spur 2). Es wurden jeweils 5 μg (A) oder 1 μg (B-D) auf einem 10 % Trenngel aufgetragen. Zum Abschätzen des Molekulargewichtes wurde ein Größenstandard verwendet.

In Abb. 3.8 (A) wurde das gereinigte Protein EIN2-CEND durch ein SDS-Gel mit anschließender Coomassie-Färbung analysiert. Hierbei ist eine deutlich sichtbare Proteinbande bei 100 kDa zu erkennen, jedoch auch weitere Banden unterhalb von 40 kDa. Nach Behandlung mit TEV-Protease konnten diese nicht mehr detektiert werden (B). Der immunologische Nachweis mit einem Anti-His-HRP Antikörper und einem Anti-EIN2 Antikörper wurde jeweils für Proben vor und nach Behandlung mit TEV-Protease durchgeführt. Vor Behandlung mit der Protease zeigt der Anti-His Antikörper ein deutliches Signal bei etwa 100 kDa, jedoch auch Banden im niedrigeren Molekulargewichtsbereich (C, Spur 1). Im Gegensatz dazu ist mit dem Anti-EIN2 Antikörper nur eine Bande bei ca. 100 kDa nachweisbar (D, Spur 1). Die Behandlung mit TEV-Protease diente zur Abspaltung des Histidin-Tags, welcher für nachfolgende Interaktionsstudien mit Metallionen entfernt werden musste. Nach Behandlung mit TEV-Protease ist kein Signal mehr für das gereinigte EIN2-CEND mit dem Anti-His Antikörper erkennbar (C, Spur 2) während mit dem Anti-EIN2 Antikörper ein Signal bei ca. 100 kDa detektiert wurde. Die Proteinbanden bei etwa 100 kDa wurden EIN2-CEND mit einem theoretischen Molekulargewicht von 95 kDa bzw. 92 kDa ohne Histidin-Tag zugeordnet.

3.2.2 Quantifizierung der Rezeptor-EIN2-Interaktion über *Microscale Thermophorese*

Die Interaktion der Ethylenrezeptoren ETR1 und ETR2 mit der zytosolischen Domäne von EIN2 wurde über *Microscale Thermophorese* bestimmt. Die Proteine wurden wie in Kapitel 2.4.1, 2.4.2 und 2.4.4 beschrieben gereinigt und mit dem Amin-reaktiven Farbstoff Alexa488 markiert (vgl. 2.7.9) oder als Titrationspartner ohne Markierung direkt in der Messung eingesetzt. Das Ergebnis der gemessenen Interaktionen ist in Abb. 3.9 dargestellt.

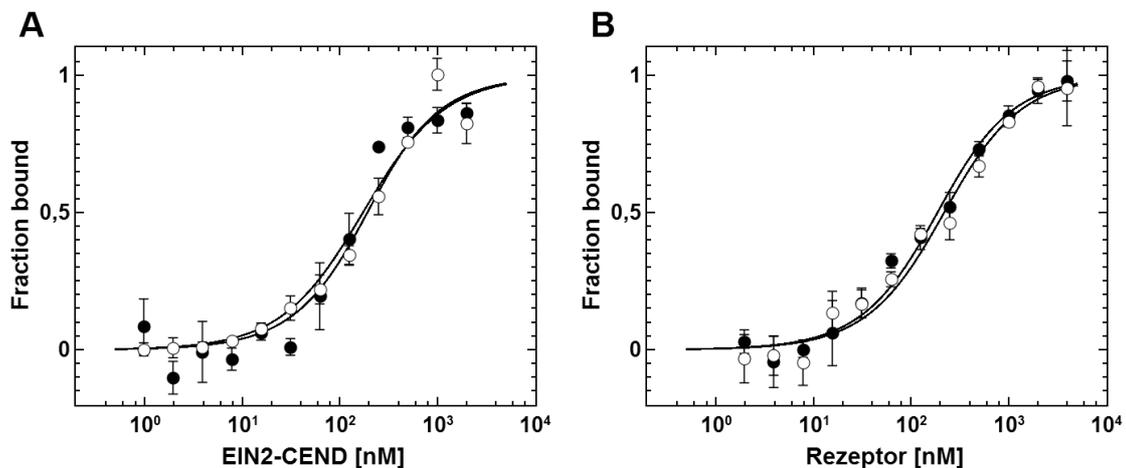


Abb. 3.9.: Quantifizierung der Interaktion zwischen den Rezeptoren und EIN2-CEND. In (A) ist die Messung von Alexa488-markiertem ETR1 (○) bzw. ETR2 (●) unter Titration von EIN2-CEND dargestellt. In (B) wurde EIN2-CEND mit Alexa488-markiert und unter Titration von ETR1 (○) bzw. ETR2 (●) gemessen. Für die Bindung von ETR1_{Alexa488} – EIN2-CEND (A, ○) wurde ein K_d von $140 \text{ nM} \pm 20 \text{ nM}$ und für EIN2-CEND_{Alexa488} – ETR1 (B, ○) ein K_d von $179 \text{ nM} \pm 24 \text{ nM}$ bestimmt. Die Bindung zwischen ETR2_{Alexa488} – EIN2-CEND (A, ●) ergab einen K_d von $161 \text{ nM} \pm 30 \text{ nM}$ und für EIN2-CEND_{Alexa488} – ETR2 (B, ●) wurde der K_d mit $147 \text{ nM} \pm 15 \text{ nM}$ bestimmt. Die Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt. K_d = Dissoziationskonstante.

Die Interaktionsmessungen wurden zunächst mit Alexa488-markierten Rezeptoren unter Titration der zytosolischen Domäne von EIN2 gemessen. Für die Interaktion von ETR1 und EIN2-CEND wurde eine Dissoziationskonstante von $140 \text{ nM} \pm 20 \text{ nM}$ gemessen. Die Quantifizierung der Interaktion zwischen ETR2 und EIN2-CEND ergab einen K_d von $161 \text{ nM} \pm 30 \text{ nM}$ (vgl. Abb. 3.9 A). Um einen Einfluss der Farbstoff-Bindung beurteilen zu können, wurden weitere Messungen, dieses Mal mit Alexa488-markiertem EIN2-CEND durchgeführt. Die so gemessene Interaktion von markiertem EIN2-CEND unter Zugabe des

Rezeptors ETR1 ergab einen K_d von $179 \text{ nM} \pm 24 \text{ nM}$. Für die Messung zwischen markiertem EIN2-CEND und ETR2 wurde ein K_d von $147 \text{ nM} \pm 15 \text{ nM}$ gemessen (vgl. Abb. 3.9 B).

3.2.3 EIN2-CEND – Ligandeninteraktion mit Ca^{2+}

Für EIN2 wird auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit mit Metallionentransportern und seiner Lokalisation am ER eine Funktion als Metallionensensor oder -transporter und dadurch eine Bindung von Metallionen vermutet [61]. Um dies zu untersuchen, wurde EIN2-CEND wie in 2.5.4 beschrieben gereinigt und mit dem Farbstoff Alexa488 markiert (vgl. 2.7.9). Die Interaktionsmessungen mit Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen ist in Abb. 3.10 dargestellt.

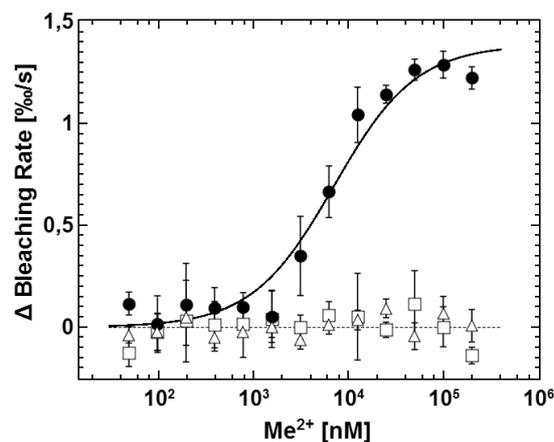


Abb. 3.10.: Quantifizierung der Interaktion zwischen EIN2-CEND und den Metallionen Ca^{2+} und Mg^{2+} . Die Messung erfolgte mit Alexa488-markiertem EIN2-CEND. Für Ca^{2+} -Ionen konnte eine Bindung an EIN2-CEND mit einer Dissoziationskonstante von $6,9 \mu\text{M} \pm 1,8 \mu\text{M}$ gemessen werden (\bullet). Als Kontrolle erfolgte die Messung mit denaturiertem EIN2-CEND unter Zugabe von Ca^{2+} -Ionen (Δ) oder alternativ die Messung vom EIN2-CEND unter Zugabe von Mg^{2+} -Ionen (\square). In beiden Kontrollen konnte keine Ligandenbindung an EIN2-CEND detektiert werden. Die Messungen erfolgten in Triplikaten. Me^{2+} = zweiwertige Metallionen.

In der durchgeführten Messung über *Microscale* Thermophorese konnte eine Ca^{2+} -Bindung an EIN2-CEND detektiert werden. Der K_d wurde auf $6,9 \mu\text{M} \pm 1,8 \mu\text{M}$ bestimmt. Das Kontrollexperiment mit Mg^{2+} zeigte keine Bindung an EIN2-CEND. Auch die Messung von denaturiertem EIN2-CEND unter Ca^{2+} -Zugabe konnte keine Bindung detektieren.

3.2.4 Einfluss der EIN2-Ca²⁺ - Bindung auf die EIN2-Rezeptor-Komplexbildung

Für den zytosolischen Teil von EIN2 konnte eine Interaktion mit den Rezeptoren ETR1 und ETR2 detektiert werden (vgl. 3.2.2). Zudem konnte in dieser Arbeit eine Bindung von Ca²⁺-Ionen an EIN2-CEND nachgewiesen werden (vgl. 3.2.3). Um nun zu untersuchen, ob die Bindung von Ca²⁺-Ionen einen Einfluss auf die Interaktion von EIN2-CEND mit den Rezeptoren ausübt, wurde diese unter gleichzeitiger Zugabe von Ca²⁺-Ionen analysiert. Die Quantifizierung der Bindung erfolgte mittels *Microscale* Thermophorese (vgl. 2.8.3)

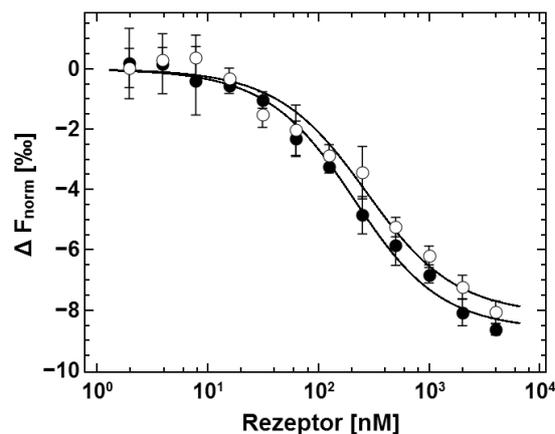


Abb. 3.11.: Bindung der Rezeptoren ETR1 und ETR2 an EIN2-CEND unter Einfluss von Ca²⁺-Ionen. EIN2-CEND_{Alexa488} wurde mit 70 μM Ca²⁺ versetzt und die Bindung von ETR1 (○) und ETR2 (●) gemessen. Hierbei wurde die EIN2-CEND_{Alexa488} – ETR1 Bindung mit einem K_d von 231 nM ± 58 nM und die EIN2-CEND_{Alexa488} – ETR2 Bindung mit einem K_d von 172 nM ± 27 nM ermittelt. Die Messungen erfolgten in Triplikaten.

Die Interaktion zwischen EIN2-CEND und den Rezeptoren ETR1 und ETR2 unter Zugabe von Ca²⁺ ist in Abb. 3.11 dargestellt. Für die Bindung zwischen EIN2-CEND/Ca²⁺ und ETR1 wurde eine Dissoziationskonstante von 231 nM ± 58 nM bestimmt. Die Interaktion von EIN2-CEND/Ca²⁺ und ETR2 wurde mit einem K_d von 172 nM ± 27 berechnet. Beide Interaktionen zeigen damit einen vergleichbaren K_d zu den ermittelten Dissoziationskonstanten der vorherigen Interaktionsmessungen ohne Zugabe von Ca²⁺ (vgl. Abb. 3.9 B).

3.2.5 Reinigung von CTR1-CFP über IMAC

Für die nachfolgende Interaktionsstudie wurde das Protein CTR1 als Fusionsprotein mit CFP heterolog in *E. coli* exprimiert (vgl. 2.4.5) und über IMAC gereinigt (vgl. 2.5.5). Zur Überprüfung des Reinheitsgrades wurde das Protein mittels SDS-PAGE (vgl. 2.7.5) aufgetrennt und entweder mit kolloidalem Coomassie gefärbt (vgl. 2.7.6) oder durch einen immunologischen Nachweis detektiert (vgl. 2.7.7 und 2.7.8). Das Ergebnis der Reinigung ist in Abb. 3.12 dargestellt.

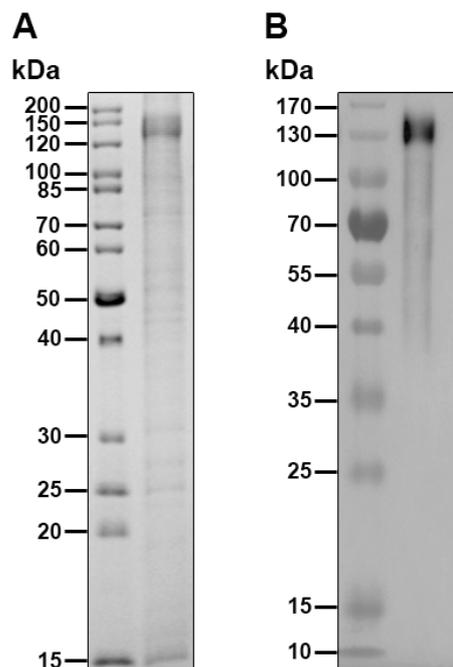


Abb. 3.12: Coomassie gefärbtes SDS-Gel und immunologischer Nachweis des Proteins CTR1-CFP.

Gereinigtes CTR1-CFP wurde mit kolloidalem Coomassie angefärbt (A). Immunologischer Nachweis des gereinigten CTR1-CFP durch Detektion mit einem Anti-His-HRP Antikörper (B). Es wurden jeweils 2,5 µg (A) oder 1 µg (B) auf einem 10 % Trenngel aufgetragen. Zum Abschätzen des Molekulargewichtes wurde ein Größenstandard verwendet.

In Abb. 3.12 (A) wurde das gereinigte Protein CTR1-CFP durch ein SDS-Gel mit anschließender Coomassie-Färbung analysiert. Hierbei war eine deutlich sichtbare Proteinbande oberhalb von 120 kDa zu erkennen. Das Gel zeigte außerdem schwache Banden als Hintergrund. Im immunologische Nachweis mit dem Anti-His-HRP Antikörper war nur eine Proteinbande bei ca. 130 kDa vorhanden, welche dem CFP-markierten CTR1 mit einem theoretischen Molekulargewicht von 122 kDa entsprach (B).

3.2.6 Quantifizierung der Rezeptor-CTR1-Interaktion über *Microscale Thermophorese*

Das gereinigte Protein CTR1-CFP wurde für die Interaktionsstudien mit Alexa488 markiert (vgl. 2.7.9), da es über die CFP-Fluoreszenz nicht ausreichend anzuregen war. Das markierte Protein wurde in Interaktionsstudien mit den Rezeptoren ETR1 und ETR2 analysiert. Die Ergebnisse nach *Microscale Thermophorese* (vgl. 2.8.3) sind in Abb. 3.13 dargestellt.

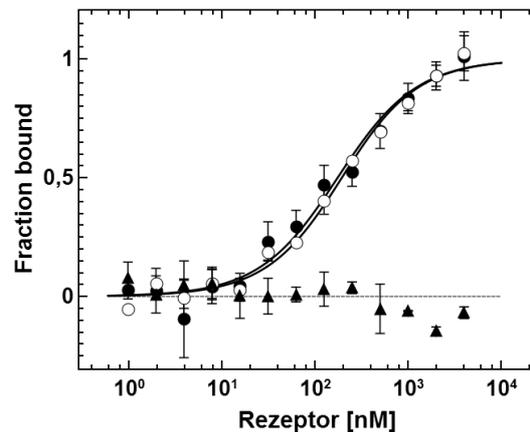


Abb. 3.13.: Bindung von ETR1 und ETR2 an CTR1-CFP. Es wurden die Bindungen von CTR1-CFP_{Alexa488} und ETR1 (○), von CTR1-CFP und ETR2 (●) und denaturiertem CTR1-CFP und ETR2 (▲) gemessen. Hierbei wurde für CTR1-CFP_{Alexa488} – ETR1 ein K_d von $169 \text{ nM} \pm 15 \text{ nM}$ und für CTR1-CFP_{Alexa488} – ETR2 ein K_d von $165 \text{ nM} \pm 20 \text{ nM}$ ermittelt. Für die Messung zwischen den denaturierten Proteinen CTR1-CFP und ETR2 (▲) konnte keine Bindung gemessen werden. Die Messungen erfolgten in Triplikaten, für die Denaturierung in Duplikaten. K_d = Dissoziationskonstante.

Für die Bindung zwischen CTR1-CFP und ETR1 wurde eine Dissoziationskonstante von $169 \text{ nM} \pm 15 \text{ nM}$ bestimmt. Die Interaktion von CTR1-CFP und ETR2 wurde mit einem K_d von $165 \text{ nM} \pm 20 \text{ nM}$ berechnet. Die als Negativkontrolle durchgeführte Messung der denaturierten Proteine zeigte keine Bindung zwischen CTR1-CFP mit ETR2.

3.3 Markierung des Membranproteins ETR1 mit dem Fluorophor FIAsh

Um eine Markierung mit dem Farbstoff FIAsh vornehmen zu können, muss das Zielprotein ein Tetracysteinmotiv enthalten. In ETR1 wurden hierfür AS-Substitutionen über PCR-Mutagenese im Bereich der Transmembrandomäne vorgenommen (vgl. 2.2.3.2).

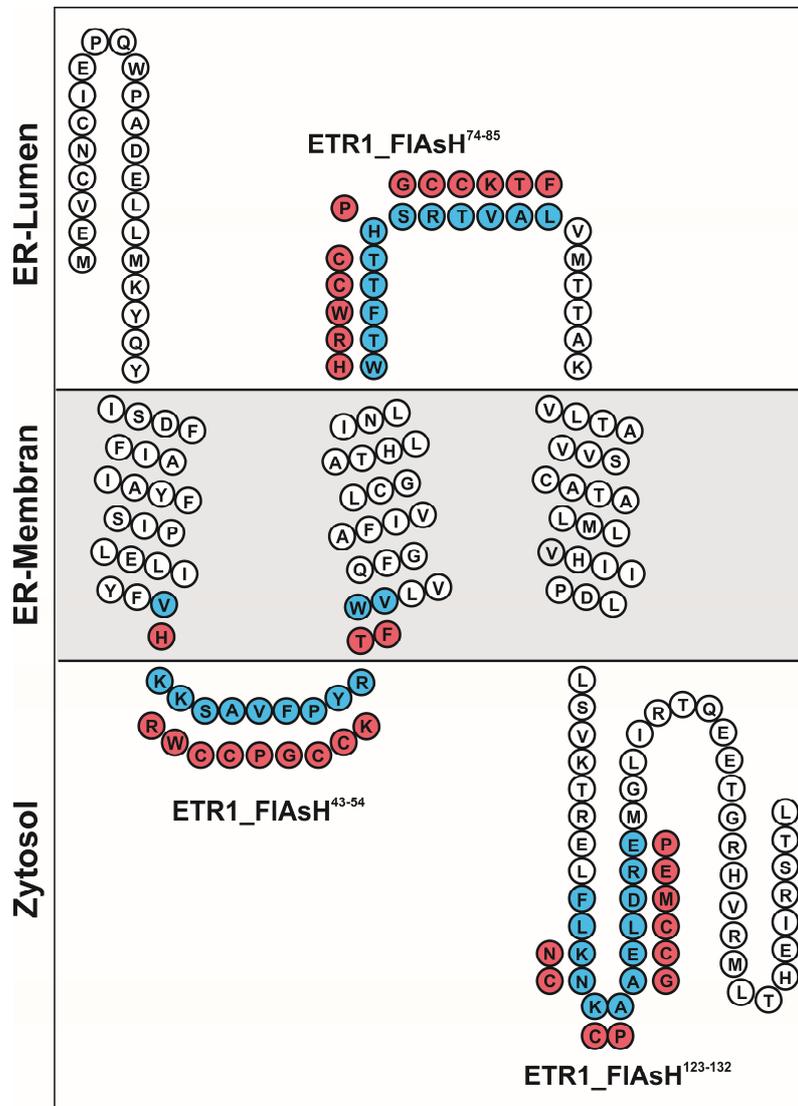


Abb. 3.14.: Topologiemodell der Transmembrandomäne von ETR1 (erstellt mit Protter [122]). Dargestellt ist die Aminosäuresequenz der Transmembrandomäne von ETR1 (AS 1-157). Die über PCR-Mutagenese eingefügten AS-Substitutionen von ETR1_FIAsh⁴³⁻⁵⁴, ETR1_FIAsh⁷⁴⁻⁸⁵ und ETR1_FIAsh¹²³⁻¹³² sind rot hervorgehoben. Die entsprechende AS-Sequenz von ETR1 ist blau hinterlegt.

In Abb. 3.14 ist ein Topologiemodell von ETR1 aufgeführt, welches ETR1 mit seinen drei Transmembranhelices in der Membran des Endoplasmatischen Retikulum darstellt [130,131].

Die eingefügten AS-Substitutionen der ETR1-Mutanten ETR1_FIAsh⁴³⁻⁵⁴, ETR1_FIAsh⁷⁴⁻⁸⁵ und ETR1_FIAsh¹²³⁻¹³² sind farblich hervorgehoben. Hierbei wurden zwei optimierte Tetracysteinmotive verwendet, die das Tetracysteinmotiv N- und C-terminal um jeweils 3 Aminosäuren verlängern (vgl. 2.1.8).

3.3.1 Expression der ETR1-Mutanten mit Tetracysteinmotiv

Nach durchgeführter Klonierung der ETR1_FIAsh-Mutanten (vgl. 2.1.8 und 2.2.3.2) wurden diese in C43(DE3)-Zellen transformiert (vgl. 2.3.2). Die Expression erfolgte analog zum Wildtyp ETR1 (vgl. 2.4.1). Die Expression erfolgte durch immunologischen Nachweis unter Verwendung eines Anti-His HRP Antikörpers kontrolliert (vgl. 2.7.5, 2.7.7 und 2.7.8). Das Ergebnis der Expressionen ist in Abb. 3.15 dargestellt.

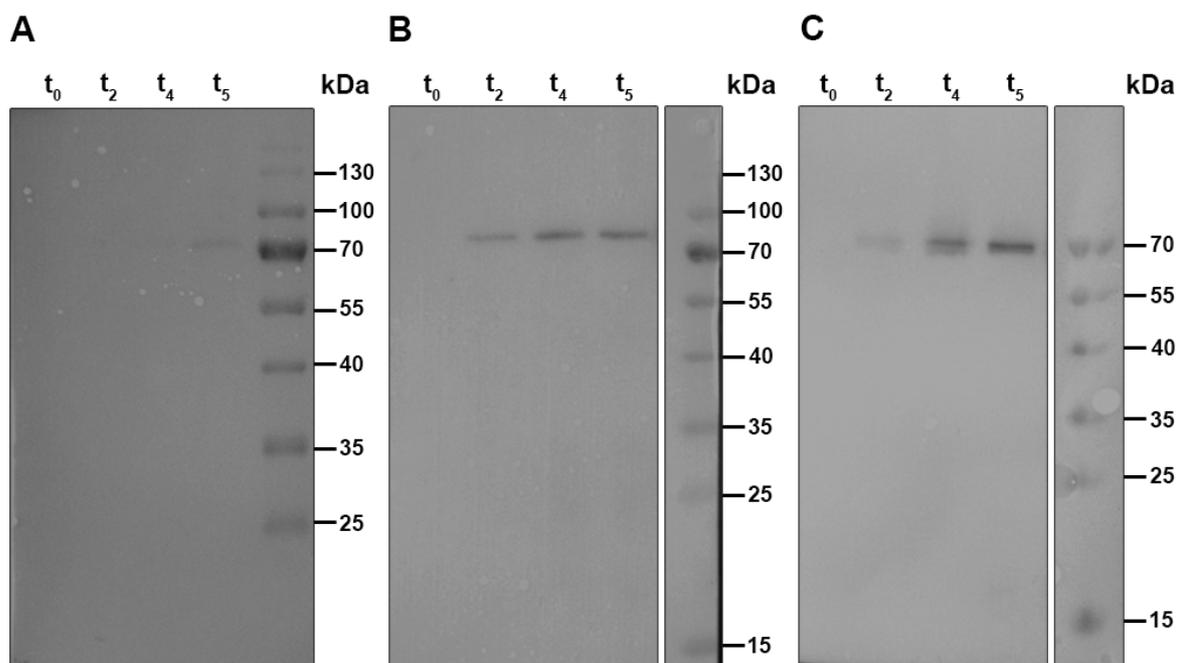


Abb. 3.15.: Expression der ETR1_FIAsh-Mutanten in *E. coli* C43 (DE)-Zellen. Es wurden jeweils Proben der Expression von ETR1-FIAsh⁴³⁻⁵⁴ (A), ETR1-FIAsh⁷⁴⁻⁸⁵ (B) und ETR1-FIAsh¹²³⁻¹³² (C) zum Zeitpunkt der Induktion (t₀), sowie zwei (t₂), vier (t₄) und fünf (t₅) Stunden nach der Induktion entnommen. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE über ein 12 % Trenngel und immunologischem Nachweis durch einen Anti-His-Antikörper. Zur Abschätzung des Molekulargewichtes wurde ein Größenstandard verwendet.

Wie in Abb. 3.15 dargestellt, verlief die Expression der einzelnen ETR1_FIAsh-Mutanten mit unterschiedlichem Erfolg. Für ETR1-FIAsh⁴³⁻⁵⁴ (A) war lediglich 5 h nach Induktion der Expression eine sehr schwache Bande bei knapp über 70 kDa zu erkennen, welche dem zu exprimierenden Konstrukt mit einem theoretischen Molekulargewicht von 85 kDa entsprach. Die Konstrukte ETR1-FIAsh⁷⁴⁻⁸⁵ (B) und ETR1-FIAsh¹²³⁻¹³² (C) führten zu einer etwas größeren Menge an exprimiertem Protein, erkennbar an der jeweils nach 2 h auftretenden Bande bei knapp über 70 kDa, welche bis 5 h nach Induktion an Intensität zunahm.

3.3.2 Markierung und Reinigung der Mutanten ETR1_FlAsH⁷⁴⁻⁸⁵ und ETR1_FlAsH¹²³⁻¹³² über IMAC

Für die weitere Verwendung in Interaktionsstudien wurden die beiden ETR1-FlAsH Mutanten ETR1_FlAsH⁷⁴⁻⁸⁵ und ETR1_FlAsH¹²³⁻¹³² heterolog in *E. coli* exprimiert (vgl. 2.4.1) und unter nativen Bedingungen gereinigt. Hierfür wurden die Proteine zunächst mit FlAsH-EDT₂ markiert und unter Zugabe des Detergenz Fos-16 aus den *E. coli*-Membranen gelöst. Die Reinigung erfolgte mittels IMAC gereinigt (vgl. 2.6). Zur Überprüfung des Reinheitsgrades wurde das Protein mittels SDS-PAGE (vgl. 2.7.5) aufgetrennt und mit kolloidalem Coomassie gefärbt (vgl. 2.7.6).

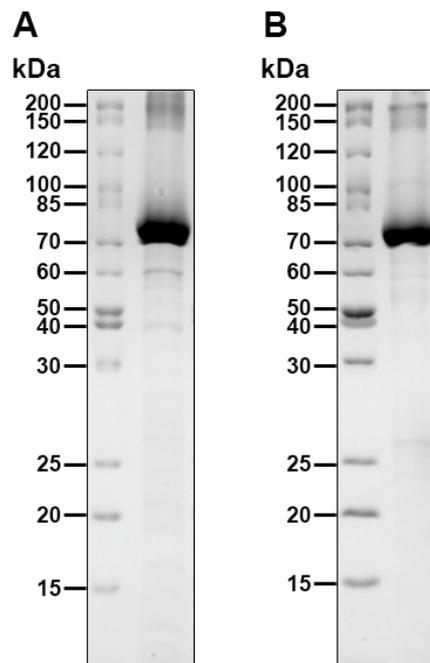


Abb. 3.16.: Coomassie gefärbtes SDS-Gel der mit FlAsH-Farbstoff markierten und gereinigten Proteine ETR1_FlAsH⁷⁴⁻⁸⁵ und ETR1_FlAsH¹²³⁻¹³². Markiertes und nativ gereinigtes ETR1_FlAsH⁷⁴⁻⁸⁵ (A) und ETR1_FlAsH¹²³⁻¹³² (B) wurde mit kolloidalem Coomassie angefärbt. Es wurden jeweils 5 µg der jeweiligen Proteine auf einem 12 % Trenngel aufgetragen. Zum Abschätzen des Molekulargewichtes wurde ein Größenstandard verwendet.

In Abb. 3.16 sind die markierten und gereinigten Proteine ETR1_FlAsH⁷⁴⁻⁸⁵ (A) und ETR1_FlAsH¹²³⁻¹³² (B) dargestellt. Hierbei waren für beide Proteine deutlich sichtbare Proteinbanden oberhalb von 70 kDa zu erkennen, welche den beiden Proteinen mit einem theoretischen Molekulargewicht von 85 kDa zugeordnet werden konnten. In beiden Gelen sind schwache Banden als Hintergrund erkennbar.

3.3.3 Analyse der spezifischen Markierung der Mutanten ETR1_FIAsh⁷⁴⁻⁸⁵ und ETR1_FIAsh¹²³⁻¹³² über Fluoreszenzspektroskopie

Die spezifische Markierungseffizienz der ETR1-Mutanten mit dem Farbstoff FIAsh wurde über Fluoreszenzspektren analysiert. Hierfür wurden die beiden Mutanten ETR1_FIAsh⁷⁴⁻⁸⁵ und ETR1_FIAsh¹²³⁻¹³² wie in Kapitel 2.6 beschrieben mit FIAsh markiert und über IMAC gereinigt. Als Kontrolle wurde wildtypisches ETR1 unter den gleichen Bedingungen mit FIAsh behandelt und ebenfalls über IMAC gereinigt. Das Ergebnis der FIAsh-Markierung ist in Abb. 3.17 dargestellt.

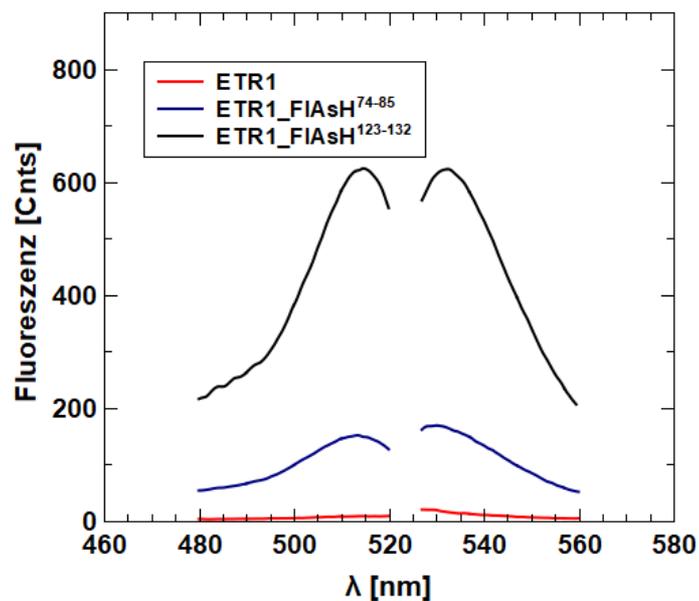


Abb. 3.17.: Fluoreszenzspektrum der mit FIAsh-markierten Proteine ETR1, ETR1_FIAsh⁷⁴⁻⁸⁵ und ETR1_FIAsh¹²³⁻¹³². Dargestellt sind die gemessenen Fluoreszenzspektren der FIAsh-markierten Proteinen ETR1 (rot), ETR1_FIAsh⁷⁴⁻⁸⁵ (blau) und ETR1_FIAsh¹²³⁻¹³² (schwarz). Die Spektren wurden aus 5 Messungen an einem LS 55 Lumineszenzspektrometer bei 700 V akkumuliert. Das Anregungsspektrum des Fluorophors FIAsh (λ_{em} : 533 nm) wurde bei 480 – 520 nm, das Emissionsspektrum (λ_{ex} : 515 nm) bei 527 – 560 nm gemessen.

Abb. 3.17 zeigt die gemessenen Fluoreszenzspektren der mit FIAsh behandelten Proteine ETR1, ETR1_FIAsh⁷⁴⁻⁸⁵ und ETR1_FIAsh¹²³⁻¹³². Die Fluoreszenzintensität des Emissionsspektrums für gereinigtes ETR1 lag bei ca. 15 Counts, während für ETR1_FIAsh⁷⁴⁻⁸⁵ ca. 160 Counts und für ETR1_FIAsh¹²³⁻¹³² ca. 625 Counts detektiert wurden. Umgerechnet machte die Emissionsintensität von ETR1 hierbei ca. 9,4 % verglichen zu ETR1_FIAsh⁷⁴⁻⁸⁵ und ca. 2,4 % verglichen zu ETR1_FIAsh¹²³⁻¹³² aus.

3.3.4 Funktionelle Charakterisierung der FIAsh-markierten Rezeptoren über die Interaktion mit EIN2

Die Interaktionen der FIAsh-markierten Rezeptoren ETR1_FIAsh⁷⁴⁻⁸⁵ und ETR1_FIAsh¹²³⁻¹³² mit der zytosolischen Domäne von EIN2 wurden erneut über *Microscale* Thermophorese bestimmt. Die Proteine wurden wie in Kapitel 2.6 und 2.5.4 beschrieben gereinigt und für die folgenden Messungen verwendet, wobei EIN2-CEND als Titrationspartner eingesetzt wurde. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.18 dargestellt.

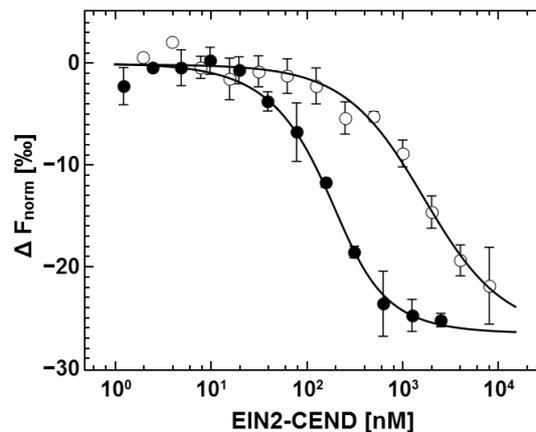


Abb. 3.18.: Quantifizierung der Interaktion zwischen den FIAsh-markierten Rezeptoren und EIN2-CEND. Dargestellt ist die Messung von ETR1_FIAsh⁷⁴⁻⁸⁵ (●) bzw. ETR1_FIAsh¹²³⁻¹³² (○) unter Zugabe von EIN2-CEND. Für die Bindung von ETR1_FIAsh⁷⁴⁻⁸⁵ – EIN2-CEND (●) wurde ein K_d von $76 \text{ nM} \pm 18 \text{ nM}$ und für ETR1_FIAsh¹²³⁻¹³² – EIN2-CEND (○) ein K_d von $1515 \text{ nM} \pm 358 \text{ nM}$ bestimmt. Die Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt. K_d = Dissoziationskonstante.

Für beide FIAsh-markierten Rezeptoren konnte eine Bindung an EIN2-CEND festgestellt werden. Dabei wurde für ETR1_FIAsh⁷⁴⁻⁸⁵ und EIN2-CEND eine Dissoziationskonstante von $76 \text{ nM} \pm 18 \text{ nM}$ gemessen. Die Quantifizierung der Interaktion zwischen ETR1_FIAsh¹²³⁻¹³² und EIN2-CEND hingegen ergab einen deutlich höheren K_d von $1515 \text{ nM} \pm 358 \text{ nM}$ (vgl. Abb. 3.9).

3.4 *In vitro* Quantifizierung der homo- und heteromeren Rezeptor-Rezeptor-Interaktionen

3.4.1 Reinigung der isolierten ETR1-Transmembrandomäne über IMAC

Für die Analyse einer möglichen Interaktion zwischen der isolierte ETR1-Transmembrandomäne (ETR1-TM) mit den Rezeptoren ETR1 und ETR2 wurde die ETR1-Mutante heterolog in *E. coli* exprimiert (vgl. 2.4.3) und unter nativen Bedingungen gereinigt. Hierfür wurde ETR1-TM unter Zugabe von Fos-16 aus den *E. coli*-Membranen gelöst und über IMAC gereinigt (vgl. 2.5.3). Zur Überprüfung des Reinheitsgrades wurde das Protein mittels SDS-PAGE (vgl. 2.7.5) aufgetrennt und entweder mit kolloidalem Coomassie gefärbt (vgl. 2.7.6) oder durch einen immunologischen Nachweis detektiert (vgl. 2.7.7 und 2.7.8).

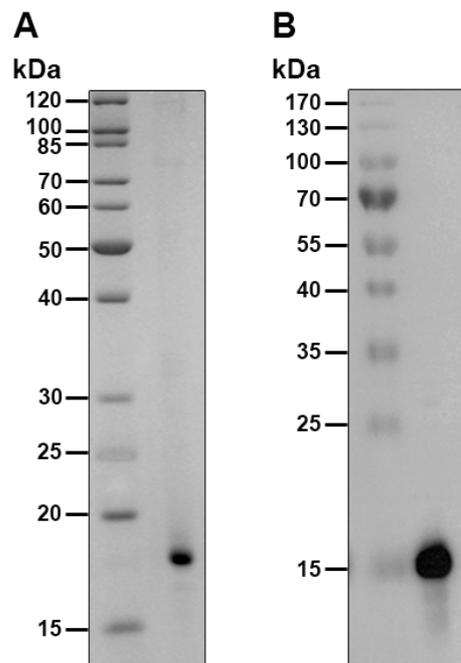


Abb. 3.19.: SDS-PAGE des gereinigten Proteins ETR1-TM. Coomassie gefärbtes Gel der nativ gereinigten ETR1-Transmembrandomäne (A) und immunologischer Nachweis durch Detektion mit einem Anti-His Antikörper (B). Es wurden jeweils 1 μg des gereinigten Proteins (A und B) auf einem 12 % Trenngel aufgetragen. Zum Abschätzen des Molekulargewichtes wurde ein Größenstandard verwendet.

Die Reinigung von ETR1-TM wurde durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassie Färbung analysiert. In Abb. 3.19 (A) ist eine deutliche Proteinbande oberhalb von 15 kDa erkennbar. Der immunologische Nachweis des Histidin-Tags der isolierten Transmembrandomäne zeigt ebenfalls nur eine Bande, diese befindet sich auf einer Höhe von 15 kDa (B). Diese kann dem Protein ETR1-TM mit einem theoretischen Molekulargewicht von 21 kDa zugeordnet werden.

3.4.2 Quantifizierung der Rezeptor-Rezeptor-Komplexbildung über *Microscale Thermophorese*

Zur Untersuchung der homo- und heteromeren Komplexbindung von ETR1 und ETR2 wurden diese Rezeptoren unter Variation des Titrationspartners mittels *Microscale Thermophorese* analysiert (vgl. 2.8.3 und Abb. 3.20). Zusätzlich wurde nach erfolgreicher Expression der isolierten ETR1-Transmembrandomäne diese ebenfalls für die Interaktionsmessungen verwendet (vgl. Abb. 3.19 und Abb. 3.21).

Die in Abb. 3.20 dargestellten Experimente zeigten eine Bindung für die Rezeptoren ETR1 und ETR2 untereinander. Dabei zeigte die homomere Interaktion von ETR1 den größten K_d -Wert von $326 \text{ nM} \pm 18 \text{ nM}$ und die homomere Interaktion von ETR2 den geringsten K_d -Wert von $96 \text{ nM} \pm 9 \text{ nM}$. Die Messungen der heteromeren Rezeptorinteraktion ergaben für die Titration von ETR2 zu ETR1_{Alexa488} einen K_d -Wert von $217 \text{ nM} \pm 14 \text{ nM}$ und für die umgekehrte Titration von ETR1 zu ETR2_{Alexa488} einen K_d -Wert von $177 \text{ nM} \pm 18 \text{ nM}$.

Die ermittelten Werte liegen hierbei in einem vergleichbaren Bereich. Die durchgeführten Kontrollen mit den denaturierten Proteinen zeigten bei keiner der durchgeführten Messungen eine Bindung an.

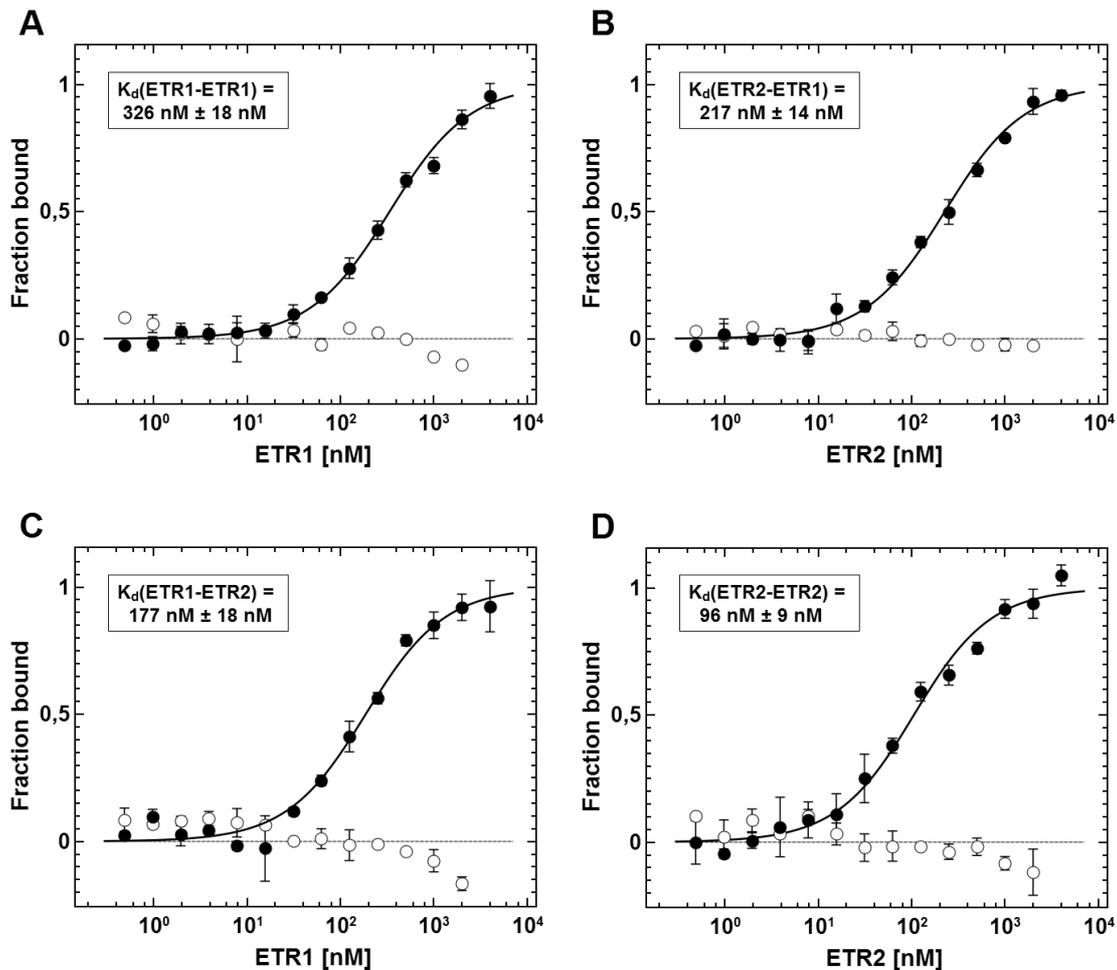


Abb. 3.20.: Bindung der Rezeptoren ETR1 und ETR2 untereinander. Die Interaktion der Rezeptoren ETR1 und ETR2 untereinander wurde durch Messungen der Bindung von ETR1_{Alexa488} an ETR1 (A), ETR2_{Alexa488} an ETR1 (B), ETR1_{Alexa488} an ETR2 (C) und ETR2_{Alexa488} an ETR2 (D) untersucht. Durch Quantifizierung ergaben sich für ETR1–ETR1 (A) ein K_d -Wert von $326 \text{ nM} \pm 18 \text{ nM}$, für ETR2–ETR1 (B) ein K_d -Wert von $217 \text{ nM} \pm 14 \text{ nM}$, für ETR1–ETR2 (C) ein K_d -Wert von $177 \text{ nM} \pm 18 \text{ nM}$ und für ETR2–ETR2 (D) ein K_d -Wert von $96 \text{ nM} \pm 9 \text{ nM}$. Die Messungen erfolgten in Triplikaten (●). Als Kontrolle erfolgte die Messung von in SDS und DTT denaturierten Proteinen in Duplikaten (○). K_d = Dissoziationskonstante.

Für die isolierte ETR1-Transmembrandomäne konnte ebenfalls eine Bindung an die Rezeptoren ETR1 und ETR2 gezeigt werden (vgl. Abb. 3.21).

Die gemessenen K_d -Werte von $491 \text{ nM} \pm 20 \text{ nM}$ für ETR1 mit ETR1-TM und von $145 \text{ nM} \pm 9 \text{ nM}$ für ETR2 mit ETR1-TM verdeutlichen anschaulich die unterschiedlichen Affinitäten der einzelnen Rezeptoren zueinander. Die Interaktion zwischen ETR2 und ETR1-TM war deutlich niedriger. Zudem unterstützen beide Werte die in Abb. 3.20 dargestellten Bindungen, die eine höhere Affinität des Typ-I Rezeptors ETR1 zu dem Typ-II Rezeptor ETR2 erkennen ließen.

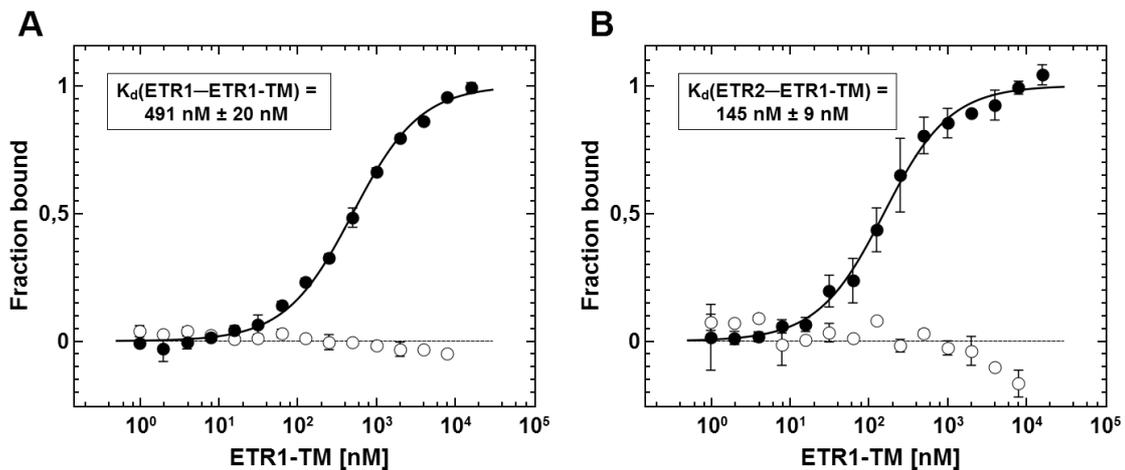


Abb. 3.21.: Bindung der isolierten ETR1 Transmembrandomäne an die Rezeptoren ETR1 und ETR2. Die Interaktion der isolierten ETR1 Transmembrandomäne (ETR1-TM) mit den Rezeptoren ETR1 und ETR2 wurde durch Messungen der Bindung von ETR1-TM an ETR1 (A) und ETR1-TM an ETR2 (B) untersucht. Durch Quantifizierung ergaben sich für $\text{ETR1}_{\text{Alexa488}} - \text{ETR1-TM}$ (A) ein K_d -Wert von $491 \text{ nM} \pm 20 \text{ nM}$ und für $\text{ETR2}_{\text{Alexa488}} - \text{ETR1-TM}$ (B) ein K_d -Wert von $145 \text{ nM} \pm 9 \text{ nM}$. Die Messungen erfolgten in Triplikaten (●). Als Kontrolle erfolgte die Messung von in SDS und DTT denaturierten Proteinen in Duplikaten (○). K_d = Dissoziationskonstante.

3.4.3 Einfluss des Phosphorylierungsstatus der Rezeptoren auf die Rezeptor-Rezeptor-Interaktion

Für die Rezeptoren ETR1 und ETR2 konnten sowohl die homomere als auch heteromere Interaktionen gezeigt werden (vgl. 3.4.2). Beide Rezeptoren zeigten zudem eine Autokinaseaktivität (vgl. 3.1.5). Um nun den Einfluss von möglichen Phosphorylierungen auf die Rezeptorinteraktionen abschätzen zu können, wurde die homomere Rezeptorinteraktion von ETR1 weiter analysiert. Hierzu wurden Mutanten von ETR1 verwendet, bei denen das Histidin an Position 353 entweder durch Alanin (ETR1^{H353A}) oder durch Glutamat (ETR1^{H353E}) ersetzt wurde. Diese Proteine wurden wie in Kapitel 2.5.3 beschrieben gereinigt und in den folgenden Messungen eingesetzt (vgl. Abb. 3.22).

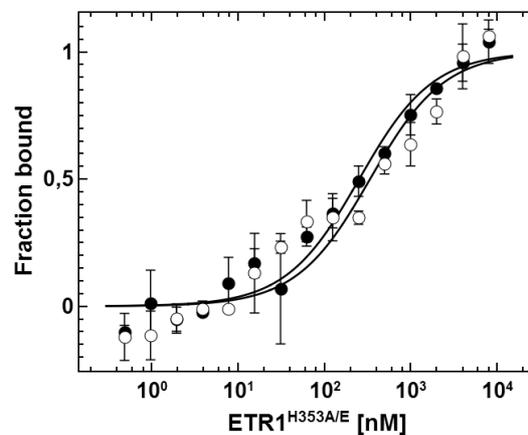


Abb. 3.22.: Quantifizierung der Interaktion zwischen ETR1-Phosphorylierungsmutanten. Dargestellt ist die Messung von mit Alexa488-markiertem ETR1^{H353A} mit ETR1^{H353E} (●) bzw. mit ETR1^{H353A} (○). Für die Bindung von ETR1^{H353A}_{Alexa488} – ETR1^{H353E} (●) wurde ein K_d von $245 \text{ nM} \pm 32 \text{ nM}$ und für ETR1^{H353A}_{Alexa488} – ETR1^{H353A} (○) ein K_d von $330 \text{ nM} \pm 70 \text{ nM}$ bestimmt. Die Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt. K_d = Dissoziationskonstante.

In den durchgeführten Versuchen konnten für beide Messungen Dissoziationskonstante ermittelt werden, welche vergleichbare Werte zueinander zeigten. Für die Bindung von ETR1^{H353A} und ETR1^{H353E} wurde ein K_d -Wert von $245 \text{ nM} \pm 32 \text{ nM}$ ermittelt, für ETR1^{H353A} und ETR1^{H353A} ein K_d -Wert von $330 \text{ nM} \pm 70 \text{ nM}$. Diese Affinitäten sind vergleichbar zu der vorher gemessenen Dissoziationskonstante von zwei ETR1 Wildtyp-Proteinen (vgl. 3.4.2).

3.5 *In vivo* Analyse der homo- und heteromeren Rezeptor-Rezeptor-Interaktionen

Durch die *in vitro* Analyse eines Typ-I Ethylenrezeptors mit einem Typ-II Rezeptor über *Microscale* Thermophorese (vgl. 3.4.2) konnte eine direkte Interaktion der beiden Rezeptoren mit hohen Affinitäten gezeigt werden. Da es sich hierbei jedoch um Messungen an isolierten Rezeptoren unter zusätzlicher Verwendung von Detergenzien handelt, sollte die Interaktion der Rezeptoren unter physiologischen Bedingungen bestätigt werden. Zur transienten Expression der Rezeptoren aus *A. thaliana* wurde hierfür die Expression in *N. benthamiana* als physiologisches System gewählt.

3.5.1 Transiente Expression in *N. benthamiana* – Analyse der intrazellulären Rezeptor-Lokalisation

In anfänglichen Expressionsstudien der Rezeptoren ETR1 und ETR2 konnte keine reproduzierbare Expression der einzelnen Rezeptoren erreicht werden. Somit war es nicht möglich ein Expressionsprotokoll für die Koexpression der beiden Rezeptoren zu etablieren.

Für die folgenden *in vivo* Studien wurden deshalb die beiden Rezeptoren ERS1 (Typ-I Rezeptor) und ERS2 (Typ-II Rezeptor) gewählt, die sich von den beiden ETR-Subtypen lediglich dadurch unterscheiden, dass sie keine C-terminale Antwort-Regulator-Domäne besitzen.

Als erstes wurde die Lokalisation des Ethylenrezeptors ERS2 in Epidermiszellen von *N. benthamiana* Blättern untersucht. Um Artefakte zu minimieren, die aus einer Überexpression der Proteine resultieren können, wurde ein induzierbares Expressionssystem gewählt (vgl. Tab. 2.3). Die Lokalisation der Ethylenrezeptoren am Endoplasmatischen Retikulum konnte bereits von Grefen *et al.* in früheren Studien gezeigt werden [128]. In der vorliegenden Arbeit sollte diese Lokalisation zunächst bestätigt werden. Hierfür wurde ein Rezeptorfusionsprotein ERS2-mVenus mit dem Farbstoff FM4-64, sowie mCherry-markierten Proteinen, deren Lokalisation bekannt ist, koexprimiert. Die aufgenommenen Mikroskopiebilder sind in Abb. 3.23 dargestellt.

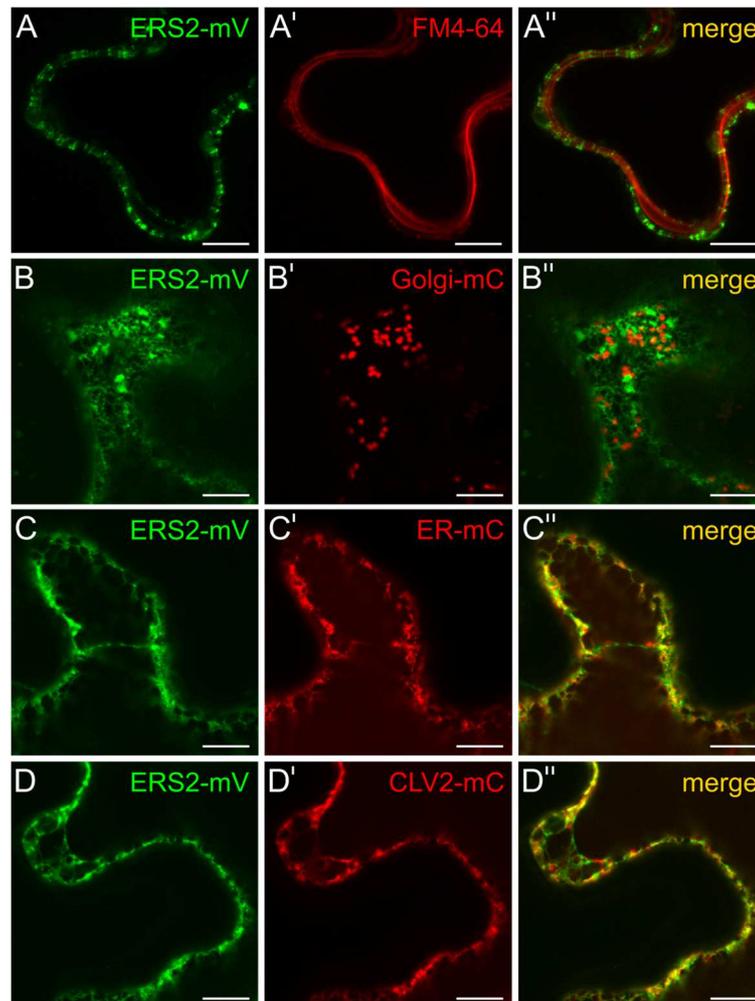


Abb. 3.23.: Intrazelluläre Lokalisation von ERS2 in *N. benthamiana* Epidermiszellen. Die Aufnahmen erfolgten in die Mitte einer Zelle (A-A'') oder unterhalb der äußeren Zellwand (B-B'', C-C'' und D-D''). ERS2-mVenus kolokalisiert weder mit dem Farbstoff FM4-64 an der Plasmamembran (A-A'') noch mit Golgi-mCherry am Golgi-Apparat (B-B''). Mit dem Marker ER-mCherry (C-C''), sowie mit CLV2-mCherry (D-D'') ist eine partielle Kolokalisation am Endoplasmatischen Retikulum (ER) erkennbar. Maßstabsbalken entspricht 10 μm . mV = mVenus, mC = mCherry, merge = Überlagerung der mVenus- und mCherry-Signale.

Zunächst wurde ERS2-mVenus in *N. benthamiana* Epidermiszellen exprimiert und zusätzlich der Farbstoff FM4-64 infiltriert. Dieser Farbstoff dient zum spezifischen Anfärben von Plasmamembranen. Abb. 3.23 A-A'' zeigt die klare Abgrenzung der Plasmamembran vom exprimierten ERS2-mVenus.

Des Weiteren ist die Expression von ERS2-mVenus zusammen mit Golgi-mCherry dargestellt. ERS2-mVenus lässt sich als netzartige Struktur erkennen, während Golgi-mCherry in punktartigen Strukturen vorliegt. Die Überlagerung der beiden Kanäle lässt keine Kollokalisierung in gleichen Strukturen erkennen (Abb. 3.23 B-B''). ERS2-mVenus lässt sich als netzartige Struktur zusammen mit ER-mCherry (Abb. 3.23 C-C'') am Endoplasmatischen Retikulum detektieren. In der Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle sind sowohl Bereiche (Abb. 3.23 C'') sichtbar, die eine deutlich sichtbare Kollokalisierung der Proteine zeigen (gelb), als auch Regionen mit keiner Kollokalisierung (grüne bzw. rote Signale). Die Koexpression von CLV2-mCherry zeigt vergleichbare Ergebnisse zu ER-mCherry. Auch hier ist eine partielle Kollokalisierung am ER erkennbar (vgl. Abb. 3.23 D'').

Für die spätere Analyse der homo- und heteromeren Ethylenrezeptorinteraktionen sollten nun zunächst Bedingungen zur Kollokalisierung dieser Rezeptoren etabliert werden. Dazu wurden erneut Expressionsstudien mit fluoreszenzmarkierten ERS2 und ERS1 in *N. benthamiana* Epidermiszellen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.24 dargestellt.

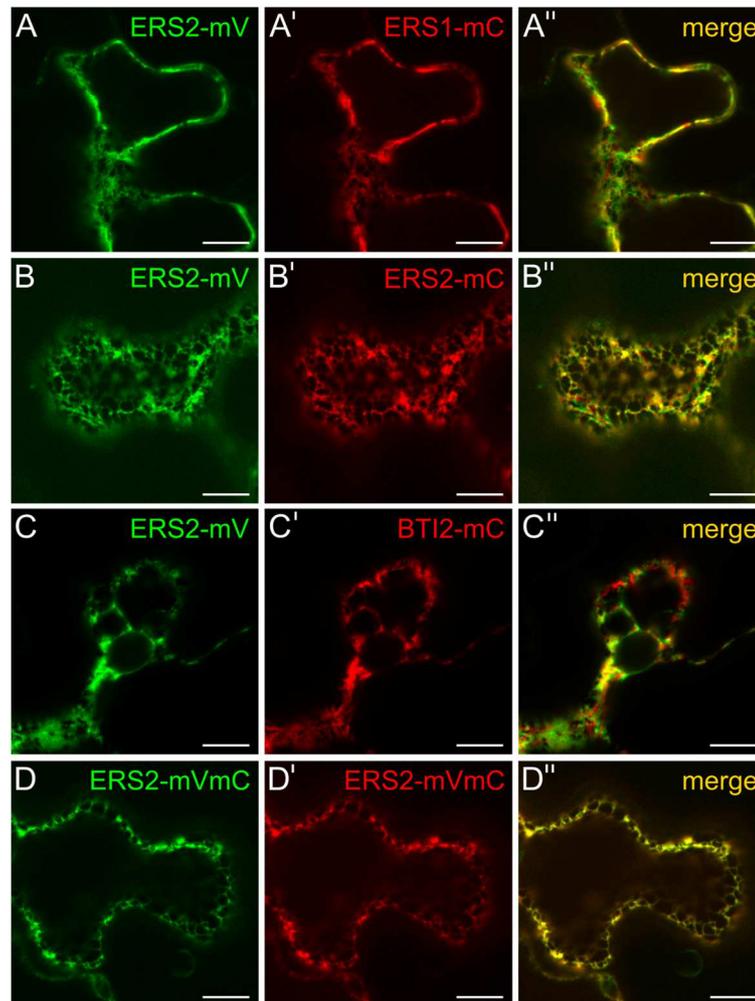


Abb. 3.24.: ERS2 zeigt Kollokationen der beiden Rezeptoren am Endoplasmatischen Retikulum.

Die Detektion der Fluorophore erfolgte unterhalb der äußeren Zellwand. ERS2-mVenus zeigt eine Kollokalisation mit ERS1-mCherry (A-A''), ERS2-mCherry (B-B'') und BTI2-mCherry (C-C'') am Endoplasmatischen Retikulum. Auch das ERS2-mVenus-mCherry Fusionsprotein lokalisiert am ER (D-D''). Maßstabsbalken entspricht 10 μm . mV = mVenus, mC = mCherry, merge = Überlagerung der mVenus- und mCherry-Signale.

In Abb. 3.24 ist die Koexpression von ERS2-mVenus mit ERS1-mCherry (A-A''), ERS2-mCherry (B-B'') und BTI2-mCherry (C-C'') zu sehen. In allen Kombinationen sind die Bereiche an denen eine Kollokalisation der einzelnen Proteine am ER stattfindet deutlich sichtbar (gelbe Signale in der Bildüberlagerung (merge)). Allerdings sind auch Regionen sichtbar, an denen keine Kollokalisation stattfindet (grüne bzw. rote Signale in den merge-Bildern). Das Konstrukt ERS2-mVenus-mCherry, bei dem beide Fluorophoren an ERS2 fusioniert sind, lässt sich ebenfalls am Endoplasmatischen Retikulum erkennen (Abb. 3.24 D-D'').

3.5.2 Fluorescence Lifetime Imaging Mikroskopie (FLIM) zur Analyse der Rezeptor-Rezeptor-Interaktion

3.5.2.1 Quantifizierung der Fluoreszenz-Lebenszeit von mVenus

Nach Etablierung von geeigneten Bedingungen zur Koexpression der Rezeptoren ERS1 und ERS2 am endoplasmatischen Retikulum (vgl. 3.5.1) sollte die putative Interaktion der beiden Rezeptoren untersucht werden. Dies wurde über *Fluorescence Lifetime Imaging Mikroskopie* (FLIM) durchgeführt (vgl. 2.8.6).

In Abb. 3.25 sind die gemessenen Fluoreszenzintensitäten der mit mVenus (Donor) und mCherry (Akzeptor) markierten Rezeptoren exemplarisch für je ein Donor-Akzeptor-Paar dargestellt. Des Weiteren ist die Fluoreszenzlebenszeit des jeweiligen Donors aufgeführt.

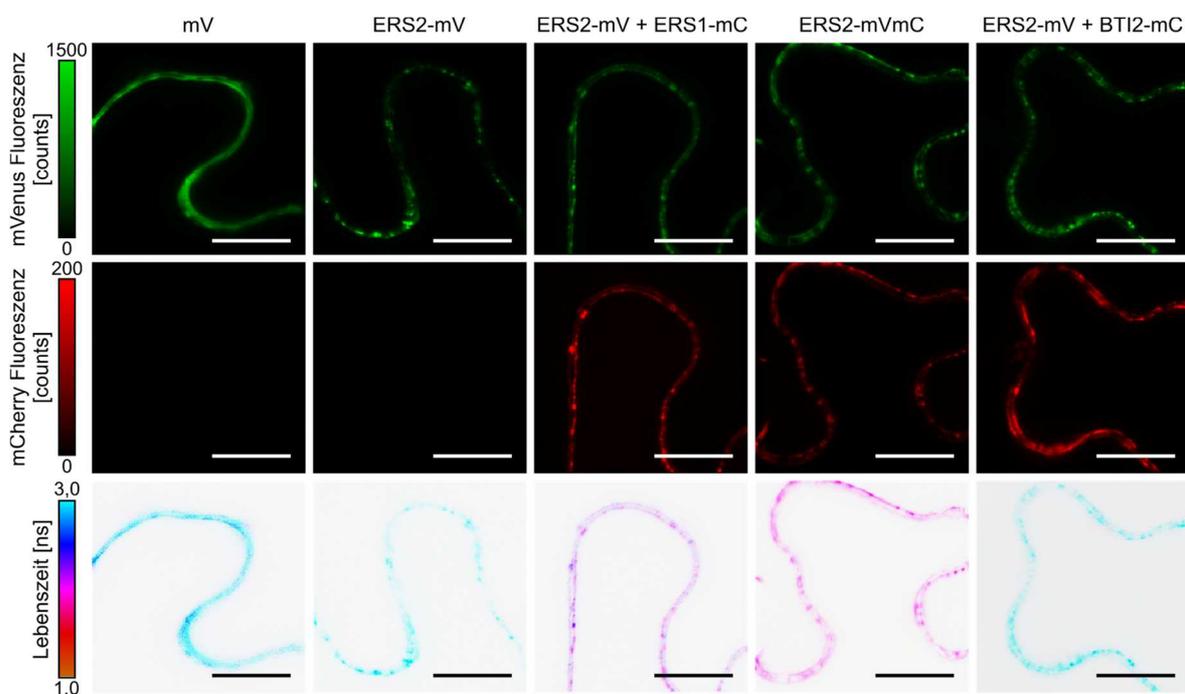


Abb. 3.25.: Darstellung der Fluoreszenzintensität der mVenus- und mCherry-markierten Rezeptoren, sowie die Lebenszeit von mVenus. Die Lebenszeit von 2,96 ns von isoliertem mVenus wird auf 2,90 ns für das Fusionsprotein ERS2-mVenus reduziert. Die Koexpression von ERS2 und ERS1 führt zu einer Reduktion der mVenus-Lebenszeit auf 2,56 ns, während die Koexpression von ERS2 und BTI2 keine Reduktion ergab (2,90 ns). Die Expression von ERS2-mVenus-mCherry zeigt die kürzeste Lebenszeit für mVenus von 2,29 ns. Maßstabsbalken entspricht 20 μm . mV = mVenus, mC = mCherry.

Zunächst wurde die Fluoreszenzlebenszeit vom isolierten mVenus bestimmt. Diese liegt hier bei 2,96 ns. Durch Fusion an den Rezeptor ERS2 verringerte sich die Lebenszeit auf 2,90 ns. Durch Koexpression von ERS2 mit ERS1 wurde die Lebenszeit auf 2,56 ns reduziert. Die direkte Fusion der beiden Fluorophore mVenus und mCherry an den Rezeptor ERS2 dient als Positivkontrolle und zeigt eine weitere Reduktion der mVenus-Lebenszeit auf 2,29 ns. Als Negativkontrolle wurde die Koexpression von ERS2-mVenus und BTI2-mCherry analysiert. Diese Rezeptoren lokalisieren beide am ER (vgl. Abb. 3.24 C-C"), zeigen aber keine Reduktion in der mVenus-Lebenszeit.

In Abb. 3.26 sind die ermittelten Lebenszeiten der unterschiedlichen Donor-Akzeptor-Paare als Box-Plot dargestellt. Dieser zeigt die Verteilung der Messwerte aus den vier (bzw. drei bei ERS2-mVenus-mCherry) unabhängig voneinander durchgeführten Messungen. Zudem sind signifikante Unterschiede der Messungen angegeben. Für die Interaktion der beiden Rezeptoren ERS2 und ERS1 konnte eine signifikante Reduktion der Lebenszeit, bezogen auf die Lebenszeit des Donors ERS2-mVenus, bestimmt werden. Die Positivkontrolle ERS2-mVenus-mCherry zeigt ebenfalls eine signifikante Reduktion. Die Negativkontrolle mit BTI2-mCherry als Akzeptor zeigt hingegen keine signifikante Reduktion der Lebenszeit.

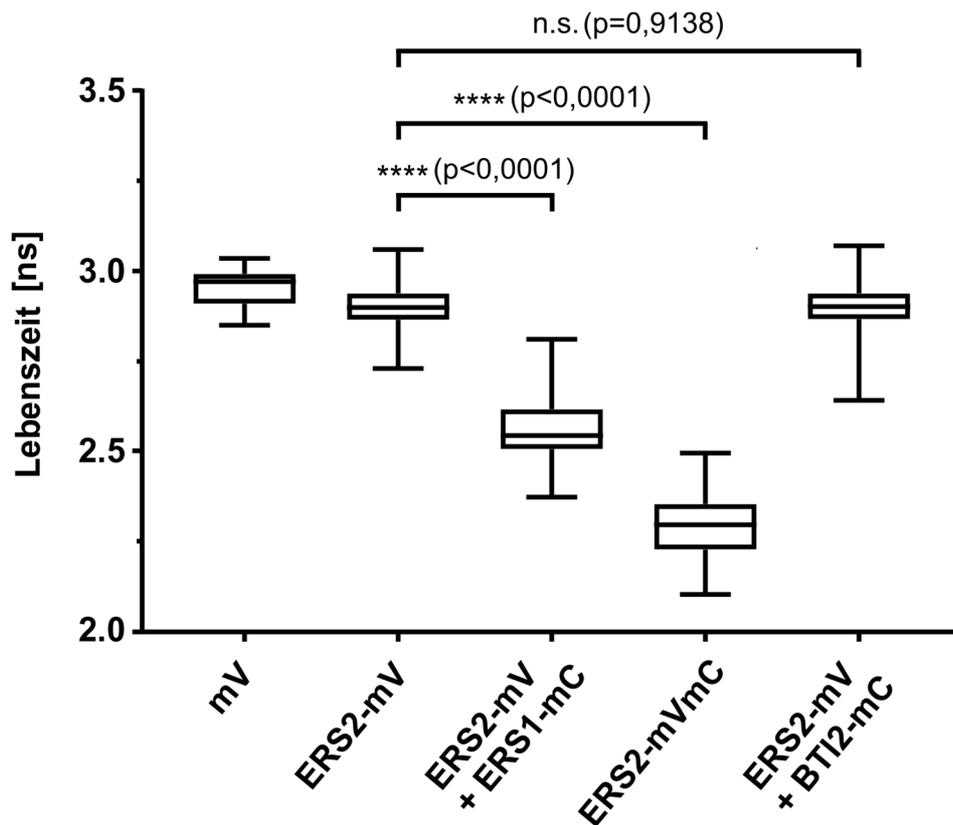


Abb. 3.26.: Ermittelte Fluoreszenzlebenszeiten der jeweiligen Donor-Akzeptor-Paare nach FLIM-Analyse. Der Blox-Plot stellt die gemessenen Lebenszeiten für isoliertes mVenus (n=16), ERS2-mVenus (n=103), ERS2-mVenus koexprimiert mit ERS1-mCherry (n=68), ERS2-mVenus-mCherry (n=50) und ERS2-mVenus koexprimiert mit BT12-mCherry (n=62) dar. Die Verteilung der Messwerte ist anhand des Median und des unteren und oberen Quartils aufgeführt. Fehlerbalken geben Maximum und Minimum der Messwerte an. p-Werte geben die Signifikanzen der Messungen wieder (ungepaarter t-test mit Welch-Korrektur, Mann-Whitney Test für den Vergleich der Lebenszeiten von ERS2-mV mit der Koexpression von ERS2-mV und BT12-mC, **** entspricht $p < 0,0001$). n.s = nicht signifikant, mV = mVenus, mC = mCherry.

Ausgehend von den gemessenen Lebenszeiten lässt sich zudem die Effizienz des Förster-Resonanz-Energie-Transfers bestimmen (vgl. 2.8.6). Dieser dient als quantitatives Maß für auftretende Protein-Protein-Interaktionen. Die ermittelten E_{FRET} -Werte sind in Tab. 3.3 aufgeführt.

Tab. 3.3.: Zusammenfassung der gemessenen mVenus-Lebenszeiten und FRET-Effizienzen (E_{FRET}) der gemessenen Donor-Akzeptor-Paare. E_{FRET} wurde aus der Lebenszeit des Donors ERS2-mVenus in Bezug zur Donor-Lebenszeit im Komplex mit dem Akzeptor ermittelt. Die Lebenszeiten sind in Abb. 3.25 und Abb. 3.26 grafisch dargestellt.

| Donor-Akzeptor-Paar | Lebenszeit [ns] | E_{FRET} [%] |
|---------------------|-----------------------|-----------------------|
| mV | 2,96 ns \pm 0,05 ns | - |
| ERS2-mV | 2,90 ns \pm 0,06 ns | - |
| ERS2-mV + ERS1-mC | 2,56 ns \pm 0,10 ns | 11,81 |
| ERS2-mVmC | 2,29 ns \pm 0,09 ns | 20,91 |
| ERS2-mV + BTI2-mC | 2,90 ns \pm 0,08 ns | 0,07 |

Die Messungen ergaben für die Positivkontrolle einen E_{FRET} von ca. 21 %, während die Negativkontrolle einen E_{FRET} von ca. 0,1 % aufweist. Bei der Koexpression von ERS2 und ERS1 konnte ein E_{FRET} von knapp 12 % bestimmt werden.

3.5.2.2 Quantifizierung der Anisotropie von mVenus

Im nächsten Schritt wurde zur Analyse von möglichen homo- bzw. heteromeren Proteininteraktionen die Anisotropie (r) von mVenus für die einzelnen Donor-Akzeptor-Paare bestimmt.

In Abb. 3.27 sind die gemessenen r -Werte für die einzelnen Donor-Akzeptor-Paare als Box-Plot dargestellt, zusätzlich sind signifikante Unterschiede angegeben. Der Box-Plot zeigt die Verteilung der Anisotropie-Werte aus den vier (bzw. drei bei ERS2-mVenus-mCherry) unabhängig voneinander durchgeführten Messungen. Die Mittelwerte der Anisotropie sind zusätzlich in Tab. 3.4 zusammengefasst.

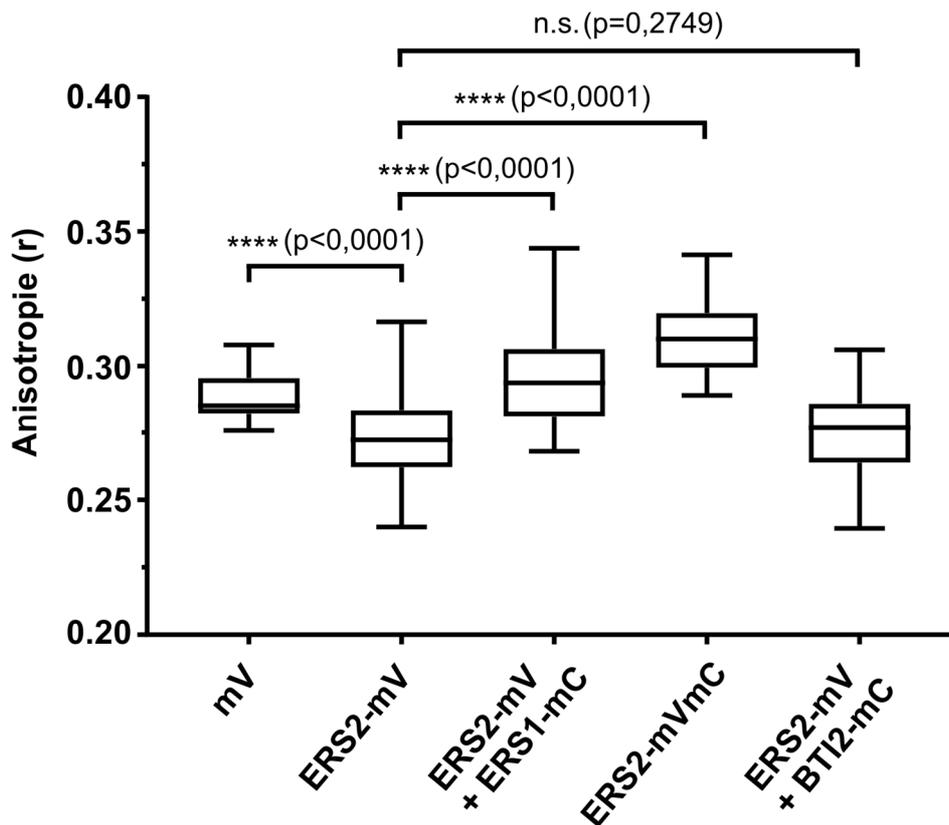


Abb. 3.27.: Ermittelte Anisotropie-Werte der jeweiligen Donor-Akzeptor Paare. Der Box-Plot führt die gemessenen Anisotropie-Werte für isoliertes mVenus (n=16), ERS2-mVenus koexprimiert mit ERS1-mCherry (n=68), ERS2-mVenus-mCherry (n=50) und ERS2-mVenus koexprimiert mit BTI2-mCherry (n=62) auf. Die Verteilung der Messwerte ist anhand des Medians und des unteren und oberen Quartils aufgeführt. Die Fehlerbalken geben das Maximum und Minimum der Messwerte an. p-Werte geben die Signifikanzen der Messungen wieder (ungepaarter t-test mit Welch-Korrektur, **** entspricht $p < 0,0001$). n.s.= nicht signifikant, mV = mVenus, mC = mCherry.

Zunächst wurde für die Anisotropie des freien mVenus ein Wert von 0,29 bestimmt. Für ERS2-mVenus, welches als Donor für die weiteren Koexpressionen diente, wurde ein r-Wert von 0,27 bestimmt. Verglichen zu freiem mVenus kam es zu einer signifikanten Reduktion der Anisotropie. Die Anisotropie für die Kombination ERS2-ERS1 ist vergleichbar mit der des freien mVenus. Beim Vergleich mit ERS2-mVenus konnte jedoch ein signifikanter Anstieg der Anisotropie von ERS2-ERS1 gemessen werden. Bei den Messungen von ERS2-mVenus-mCherry ergab sich ein Anisotropie-Wert von 0,31. Auch hierbei kam es zu einem signifikanten Anstieg verglichen mit dem Donor ERS2-mVenus.

Für die Negativkontrolle ERS2-BTI2 ergab sich ein Wert von 0,28, welcher keinen signifikanten Unterschied zum Donor darstellt.

Tab. 3.4.: Gemessene Anisotropie-Werte von mVenus der jeweiligen Donor-Akzeptor-Paare.

Die Mittelwerte der Anisotropie wurden für mVenus (n=16), ERS2-mVenus koexprimiert mit ERS1-mCherry (n=68), ERS2-mVenus-mCherry (n=50) und ERS2-mVenus koexprimiert mit BTI2-mCherry (n=62) bestimmt. mV = mVenus, mC = mCherry.

| Donor-Akzeptor-Paar | Anisotropie (r) |
|---------------------|-----------------|
| mV | 0,29 ± 0,01 |
| ERS2-mV | 0,27 ± 0,01 |
| ERS2-mV + ERS1-mC | 0,29 ± 0,02 |
| ERS2-mVmC | 0,31 ± 0,01 |
| ERS2-mV + BTI2-mC | 0,28 ± 0,02 |

4 Diskussion

Das Pflanzenhormon Ethylen spielt eine essentielle Rolle in Wachstums- und Entwicklungsprozessen einer Pflanze. Ethylen reguliert sowohl Mechanismen zur Samenkeimung, als auch zur Fruchtreifung und Seneszenz und ist an Reaktionen auf biotische und abiotische Stimuli beteiligt [12,14,17,18]. Vor allem landwirtschaftlich haben diese Mechanismen eine wichtige Bedeutung, da sie einen direkten Einfluss auf den Ertrag, Transport und die Lagerung von Nutzpflanzen nehmen.

Ein Bericht der Organisation ReFED im Jahr 2016 besagte, dass jährlich etwa 60 Millionen Tonnen an Nahrungsmitteln in den USA im Abfall landen. Somit werden ca. 40 % der angebauten Nahrungsmittel entsorgt. Die Hälfte dieser entsorgten Lebensmittel machen Früchte und Gemüse aus, an deren Entwicklung wiederum das Pflanzenhormon Ethylen eine tragende Rolle einnimmt [132,133].

Gründe für die Entsorgung dieser Lebensmittel finden sich entlang der gesamten Produktions- und Lieferkette und erstrecken sich von Ernteaussfällen auf Grund verschiedener Faktoren wie Pathogenbefall, Trockenstress oder mechanischer Stimuli der Pflanze, bis zum Verderben der Früchte und Gemüse während des Transportes oder der Lagerung. Um diese Aspekte zu verringern, ist es notwendig die Mechanismen der Ethylensignaltransduktion besser zu verstehen.

Bisherige genetische Studien haben viele der an der Weiterleitung des Ethylensignals beteiligten Komponenten bereits identifiziert. Obwohl Ethylen ein sehr kleines und strukturell einfach aufgebautes Molekül ist, sind die komplexen Mechanismen der Signalweiterleitung trotzdem noch nicht vollständig charakterisiert [11,15,41,134]. Besonders die an der Signalwahrnehmung und -transduktion beteiligten Typ-II Ethylenrezeptoren sind, im Gegensatz zu den Typ-I Ethylenrezeptoren, noch wenig untersucht.

Im Fokus dieser Arbeit stand daher die Charakterisierung von Typ-II Ethylenrezeptoren. Die quantitative Analyse von vorliegenden Proteininteraktionen sollte eine genauere Vorstellung der an der Signalweiterleitung und Regulation beteiligten Prozesse und eine Grundlage für weitere biochemische Analysen liefern.

4.1 Molekulare Charakterisierung der Ethylenrezeptoren ETR1 und ETR2

4.1.1 Heterologe Expression und Reinigung des Typ-II Rezeptors ETR2

Die genauen Mechanismen zwischen Typ-II Rezeptoren und anderen Komponenten des Ethylensignalweges sind bisher noch wenig untersucht. Um einen Einblick in das komplexe Zusammenspiel der Rezeptoren untereinander und mit nachfolgenden Signalkomponenten zu erhalten, sollte in dieser Arbeit die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen unter Beteiligung des Typ-II Rezeptors ETR2 erfolgen. Der Rezeptor ETR2 wurde als Vertreter der Typ-II Rezeptoren gewählt, da dieser, wie auch ETR1, die Antwort-Regulator-Domäne besitzt [42]. Dadurch sollten falsch negative Ergebnisse auf Grund einer fehlenden Domäne vermieden werden. EIN4, als weiterer Vertreter der Typ-II Rezeptorfamilie, wurde auf Grund des hier immer noch vorhandenen Histidins in der Kinase-Domäne nicht verwendet, um einen Einfluss dieser Aminosäure auf mögliche Interaktionen besser beurteilen zu können [42].

Als Voraussetzung für alle weiteren biochemischen Quantifizierungen war es zunächst notwendig ETR2 in hoher Reinheit und in funktionalem Zustand zu isolieren. Hierfür mussten sowohl Methoden zur Expression als auch zur Reinigung etabliert werden.

Dazu wurde der Rezeptor ETR2 als Codon-optimierte DNA in *E. coli* C43(DE3)-Zellen exprimiert. Die Durchführung der Expression bei 16°C und die Zugabe von 2 % Ethanol konnte dabei die, in früheren Expressionsstudien beobachtete, Bildung von *Inclusion bodies* reduzieren. Die generelle Bildung von *Inclusion bodies* kann durch gesteigerte Translationsraten erklärt werden, wie sie bei der Verwendung von Codon-optimierter DNA oft zu Stande kommen [135,136]. Eine Reduktion der Expressionstemperatur wiederum verringert zwar die erreichbare Proteinausbeute, aber durch eine gleichzeitige Expression von Hitzeschockproteinen auch die Menge an fehlgefaltetem Protein [137]. Der Nachweis der ETR2-Expression erfolgte durch Verwendung eines Anti-His-Antikörper, welcher den C-terminalen Dekahis-Tag des Proteins detektierte. Wie in Abb. 3.2 ersichtlich, musste die Expression von ETR2 bereits 4 Stunden nach Induktion beendet werden, da es nach 5 Stunden bereits zu einem vermehrten Abbau des Proteins kam. Des Weiteren treten bereits eine Stunde nach Induktion zwei zusätzliche Proteinbanden auf. Hierbei kann es

sich möglicherweise um Abbauprodukte von ETR2 oder nicht vollständig translatiertes Protein handeln.

Im weiteren Verlauf konnte die Analyse über SDS-PAGE zeigen, dass ETR2 über IMAC in hoher Reinheit gewonnen werden konnte. Zudem konnten die bei der Expression zusätzlich aufgetretenen Banden nicht mehr detektiert werden, was für eine Entfernung während der Reinigung spricht (vgl. Abb. 3.3 A und B). Ein zusätzlicher Nachweis zeigte außerdem eine Kontamination von ETR2 mit DnaK, welche jedoch ebenfalls erfolgreich durch die IMAC-Reinigung entfernt werden konnte (vgl. Abb. 3.3 C).

4.1.2 Reinigung des Typ-I Rezeptors ETR1

Als direkter Vergleich zu ETR2 sollten zusätzlich Interaktionsstudien mit ETR1 durchgeführt werden. Um vergleichbare Messbedingungen für beide Rezeptoren gewährleisten zu können, musste die bereits etablierte Reinigung von ETR1 für diese Arbeit optimiert werden. Das bis hierhin etablierte Protokoll zur nativen Reinigung von ETR1 ermöglichte keine Entfernung einer festgestellten DnaK-Kontamination [138]. Die vormals zur Lösung dieses Problem durchgeführte Reinigung unter denaturierenden Bedingungen setzte allerdings voraus, dass sich das Protein erneut in seine native Faltung überführen lässt, da ansonsten falsch negative Ergebnisse durch denaturiertes Protein auftreten [49]. Um diese Problematik zu vermeiden, wurde die native Reinigung von ETR1 unter Zugabe von ATP durchgeführt, wodurch das Hitzeschockprotein DnaK von einem Zielprotein entfernt werden kann [139]. Zusätzlich konnte die Reinigung von ETR1 durch Verwendung eines automatisierten Chromatographie-Systems zeitlich optimiert werden [140].

Als Resultat konnte ETR1 ebenfalls in hoher Reinheit, vergleichbar zu der von ETR2, gewonnen werden (Abb. 3.1 A und B). Zudem konnte die bisher immer auftretende Kontamination durch DnaK während der Reinigung entfernt werden (vgl. Abb. 3.1 C).

4.1.3 Untersuchung der Sekundärstrukturanteile der Rezeptoren ETR1 und ETR2 über CD-Spektroskopie

Die gereinigten Proteine ETR1 und ETR2 wurden durch CD-Spektroskopie auf ihre Sekundärstrukturanteile untersucht, um einen Hinweis auf deren native Faltung zu gewinnen.

Das für ETR1 erhaltene CD-Spektrum ist in Abb. 3.4 und die Vorhersagen der berechneten Sekundärstrukturanteile sind in Tab. 3.1 dargestellt. Dabei zeigen alle drei verwendeten Programme zur Strukturvorhersage keine Abweichungen vom experimentell ermittelten Spektrum. Für ETR1 wurde ein α -helikaler Anteil von 40 % und ein Anteil an ungeordneten Strukturen von ca. 25-30 % bestimmt. Dies deckt sich mit der sequenzbasierten Vorhersage durch SOPMA, welche vergleichbare Werte liefert. Größere Abweichungen wurden lediglich beim Anteil der β -Turns berechnet, für die Abweichungen von ca. 10 % auftreten. Der zusätzliche Vergleich des in dieser Arbeit gereinigten ETR1 mit dem früher denaturiert gereinigten Protein, zeigt hingegen vergleichbare Sekundärstrukturanteile und weist somit auf eine korrekte Faltung des nativ gereinigten ETR1 hin [138].

Für ETR2 wurde auf Grund der zusätzlichen Transmembranhelix ein höherer α -helikaler Anteil erwartet. CD-Spektren zeigen für α -helikale Strukturen typischerweise Minima bei 208 nm und 220 nm, welche auch für ETR2 detektierbar sind (vgl. Abb. 3.5). Der höhere α -helikale Anteil wurde sowohl durch die sequenzbasierte Analyse durch SOPMA, als auch durch die berechneten Vorhersagen des CDpro Programmpakets gezeigt, welche jeweils einen α -helikalen Anteil von ca. 48 % angeben (vgl. Tab. 3.2). Für ETR2 ergaben sich zwischen berechneter und sequenzbasierter Vorhersage größere Abweichungen von 13 % für den Anteil der β -Turns, was eine korrekte Faltung des Proteins jedoch nicht ausschließt. Zum einen ist die Genauigkeit des Programms SOPMA zur Vorhersage des Anteils an β -Turns geringer als für andere Sekundärstrukturelemente [141] und zum anderen werden α -helikale Anteile generell mit einer höheren Präzision berechnet [142]. Auf Grund der hohen Sequenzähnlichkeit von ETR1 und ETR2 von 68 % (vgl. Anhang 6.2.3) und der vergleichbaren Abweichungen für den Anteil der β -Turns, wird auch bei ETR2 von einer nativen Faltung des Proteins ausgegangen.

4.1.4 Analyse der *in vitro* Autokinaseaktivität von ETR1 und ETR2

Eine weitere Überprüfung der funktionalen Faltung der beiden Rezeptoren wurde durch Verwendung in *in vitro* Kinase-Assays vorgenommen. In früheren Studien konnte sowohl für ETR1 als Histidinkinase, als auch für ETR2 als Serin/Threonin-Kinase eine *in vitro* Autophosphorylierungsaktivität nachgewiesen werden, wobei ETR2 dabei ohne Transmembrandomäne analysiert wurde [47,106]. Diese Ergebnisse wurden in der hier durchgeführten Arbeit auf das ETR2-Volllängenprotein übertragen.

Dazu wurde zunächst der Einfluss der zweiwertigen Metallionen Mn und Mg, welche beide als Kofaktoren für ETR1 und ETR2 fungieren können, anhand der Autophosphorylierung von ETR2 ermittelt (vgl. Abb. 3.6). Eine Autophosphorylierung konnte dabei sowohl in Gegenwart von Mn^{2+} als auch Mg^{2+} nachgewiesen werden, wobei das detektierbare Signal in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen höher erscheint. Schwankungen in der eingesetzten Proteinmenge erschweren jedoch eine absolute Aussage. Nichtsdestotrotz wäre eine höhere Autophosphorylierungsaktivität von ETR2 in Gegenwart von Mg^{2+} als Kofaktor zu erwarten gewesen, da dies in früheren Studien bereits gezeigt werden konnte [47]. Um auszuschließen, dass das in der Reinigung verwendete ATP bereits zu einer Autophosphorylierung von ETR2 führt, wurden zusätzliche Messungen der Kinaseaktivität mit ETR2 durchgeführt, welches ohne ATP-Waschschritt gereinigt wurde (vgl. Abb. 3.7 A). Auch hierbei lässt sich eine deutliche Phosphorylierung feststellen, deren Stärke vergleichbar zu dem mit ATP gereinigten Protein ist. Somit scheint die Präsenz von ATP im Reinigungspuffer alleine keinen oder nur einen sehr geringen Einfluss auf die Aktivität des Proteins zu haben. Um weiterhin zu beweisen, dass es in der Tat die enzymatische Aktivität von ETR2 ist, welche für die detektierten Signale im *in vitro* Kinase-Assay verantwortlich ist, wurden Kontrollversuche mit denaturiertem ETR2 durchgeführt (vgl. Abb. 3.7 B). Das dabei ausgebliebene Phosphorylierungssignal zeigt eindeutig, dass ETR2 nach der Reinigung aktiv vorliegt. Für die zusätzlich durchgeführte Verwendung von ETR1 wurde ebenfalls eine Autophosphorylierung in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen nachgewiesen (vgl. Abb. 3.7 C). Da dies früher bereits gezeigt werden konnte [97], kann dieser Versuch ebenfalls als Kontrollexperiment verstanden werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sowohl ETR1, als auch ETR2 in nativer Konformation und aktiver Form unter Abtrennung von DnaK-Kontaminationen (welche selbst ohne die Anwesenheit von Metallionen eine Autokinaseaktivität zeigen würden) gereinigt werden konnten und für die weiteren Interaktionsstudien zur Verfügung standen [143].

4.1.5 Quantifizierung der Rezeptor-EIN2-Interaktion

Die Funktionalität des Rezeptors ETR2 wurde zusätzlich zur Bestimmung der Autokinaseaktivität über die Interaktion mit EIN2 analysiert. Für das ebenfalls ER-ständige Membranprotein EIN2 wurden bereits Interaktionen mit den Rezeptoren *in planta* gezeigt [126].

Zudem konnte *in vitro* gezeigt werden, dass der C-Terminus von EIN2 für eine Interaktion mit ETR1 ausreicht [60]. Um die Interaktion von ETR2 mit der zytosolischen Domäne von EIN2 zu analysieren, wurde die ETR2 – EIN2-Interaktion über *Microscale* Thermophorese (MST) quantifiziert und mit der bekannten ETR1 – EIN2-Interaktion verglichen. Bei der *Microscale* Thermophorese handelt es sich um eine fluoreszenzbasierte Methode, welche thermophoretische Bewegungen von Molekülen entlang eines Temperaturgradienten detektiert. Diese Methode eignet sich zur sensitiven Messung von Änderungen der Größe, Hydrathülle oder Ladung, wie sie bei Protein-Protein-Interaktionen auftreten [76,77]. Zu untersuchende Proteine wurden in dieser Arbeit über die Markierung mit dem Farbstoff Alexa488 detektiert. Im Gegensatz zu der vorher gemessenen Interaktion zwischen ETR1 – EIN2-CEND über Tryptophanfluoreszenzquench müssen hierbei keine Tryptophan-freien Mutanten erzeugt werden, was mit einer Beeinflussung der Protein-Funktionalität einhergehen kann.

Für spätere Interaktionsmessungen unter Zugabe von Metallionen (siehe Diskussion 4.1.6) musste im Zuge der Reinigung von EIN2-CEND zusätzlich der vorhandene Histidin-Tag über Behandlung mit TEV-Protease entfernt werden, da dieser zweiwertige Metallionen binden kann [144]. Wie in Abb. 3.8 (A) erkennbar, waren zudem noch Verunreinigungen nach der Reinigung von EIN2-CEND vorhanden. Der immunologische Nachweis mittels Anti-His

Antikörper deutet darauf hin, dass es sich hierbei um Abbaubanden von EIN2-CEND handelt (vgl. Abb. 3.8 C Spur 1). Diese Vermutung wird durch frühere Studien unterstützt, welche zeigen konnten, dass es sich bei EIN2 um ein instabiles Protein handelt, welches nach Translation schnell degradiert wird [59]. Wie in Abb. 3.8 C Spur 2 zu sehen ist, konnte der Histidin-Tag erfolgreich von EIN2-CEND abgetrennt werden. Des Weiteren zeigte der immunologische Nachweis, dass nach Entfernung des Histidin-Tags die vorher auftretenden Abbaubanden ebenfalls entfernt werden konnten und das Protein hierdurch in hoher Reinheit isoliert werden konnte (vgl. Abb. 3.8 B).

Um die generelle Anwendbarkeit von MST-Messungen für Interaktionsstudien an Komponenten des Ethylensignalweges zu überprüfen, wurde zunächst die Interaktion zwischen EIN2-CEND und ETR1 analysiert (vgl. Abb. 3.9.). Dazu wurde zum einen die Bindung von Alexa488-markiertem ETR1 an EIN2-CEND und zum anderen *vice versa* die Bindung von markiertem EIN2-CEND an ETR1 gemessen. Hierbei muss erwähnt werden, dass das für die Titration benötigte EIN2-CEND nicht mit der TEV-Protease behandelt wurde und somit noch den Histidin-Tag samt den bereits erwähnten Abbaubanden enthielt. Die ermittelten Dissoziationskonstanten von $140 \text{ nM} \pm 20 \text{ nM}$ und $179 \text{ nM} \pm 24 \text{ nM}$ zeigten Werte in vergleichbarem Maßstab, was sowohl einen Einfluss der Farbstoff-Markierung, des noch vorhandenen Histidin-Tags in EIN2-CEND, als auch der zusätzlichen Abbaubanden auf die gemessene Interaktion ausschließt. Zusätzlich sind die ermittelten Werte vergleichbar zu Messungen über Tryptophanfluoreszenzquench, welche je nach Phosphorylierungszustand von ETR1 einen K_d von $95 - 370 \text{ nM}$ ermittelt haben [73].

Die bisher noch nicht bestimmte Interaktion des Typ-II Rezeptors ETR2 mit EIN2-CEND wurde mit einer Affinität von $161 \text{ nM} \pm 30 \text{ nM}$ bei Einsatz vom markiertem ETR2 bzw. von $147 \text{ nM} \pm 15 \text{ nM}$ bei Einsatz von markiertem EIN2-CEND bestimmt. Somit lassen sich keine Unterschiede zwischen den Affinitäten von ETR1 und ETR2 mit EIN2-CEND feststellen. Diese Feststellung wird durch bereits *in planta* gemessene FRET-Effizienzen der beiden Rezeptoren mit EIN2 bestätigt [73]. In diesen Studien wurde die ETR1-EIN2-Bindung jedoch als geringfügig affiner eingestuft. Allerdings erfolgten diese Messungen unter Verwendung des EIN2-Vollängenproteins, so dass die Beteiligung des EIN2-Transmembranbereichs die Abweichungen von den in dieser Arbeit ermittelten Werten bedingen kann.

Generell konnte durch diese Versuche die Eignung von MST-Messungen zur Analyse des Bindungsverhaltens von Proteinen des Ethylensignalweges festgestellt werden.

4.1.6 Untersuchung der Ca²⁺- EIN2-CEND-Interaktion

Für das ER-ständige EIN2 konnte in früheren Studien eine Sequenzähnlichkeit des N-Terminus zu Metallionentransportern der Nramp-Familie gezeigt werden [61], eine Transporterfunktion für EIN2 konnte bisher jedoch noch nicht nachgewiesen werden. Zudem konnte eine Lokalisation von EIN2 am ER, welches als wichtiges Organell für die zelluläre Ca²⁺-Homöostase gilt, belegt werden [60,145]. Auf Grundlage dieser vorhandenen Sequenzähnlichkeit und der Lokalisation am ER sollte die Annahme, dass es sich bei EIN2 um ein Calcium-bindendes Protein handelt, untersucht werden. Weiterhin sollte der Einfluss einer möglichen Ca²⁺-Bindung auf die Interaktionen mit ETR1 und ETR2 getestet werden.

Die physiologische Relevanz einer Funktion als Ca²⁺-bindendes Proteins wird durch die große Bedeutung von Ca²⁺ als *second messenger* unterstrichen. Viele Effekte werden dabei durch genaue Steuerung der zeitlichen und räumlichen Änderungen der freien Ca²⁺-Konzentration im Zytosol vermittelt [146]. Eine Beteiligung von EIN2 an der Regulation des Ca²⁺-Haushaltes würde dem Ethylensignalweg eine neue Komplexität hinzufügen. Die hier durchgeführten Experimente zeigen in der Tat eine spezifische Bindung von Ca²⁺ an EIN2, welche durch die Kontrollmessungen mit denaturiertem Protein sowie Messungen mit Mg²⁺ bestätigt wurden (vgl. Abb. 3.10). Die EIN2-Ca²⁺-Interaktion ergab hierbei eine Dissoziationskonstante von 6,9 µM, welche im Bereich von Calciumbindenden Proteinen liegt. Je nach Sequenzmotiv der Calciumbindenden Proteine liegen die Ca²⁺-Bindungsaffinitäten im nanomolaren bis mittleren micromolaren Bereich [147].

Im weiteren Verlauf konnte jedoch kein Einfluss der gemessenen Ca²⁺-Bindung auf die Interaktionen mit den Ethylenrezeptoren gezeigt werden (vgl. 3.2.4), was die Bedeutung einer Ca²⁺-Bindung von EIN2 im Kontext des Ethylensignalweges unklar lässt. Da EIN2 jedoch mit weiteren Proteinen, wie z.B. CTR1 interagiert, sollte ein möglicher regulatorischer Einfluss von Ca²⁺ auf diese Interaktionen untersucht werden.

4.1.7 Quantifizierung der Rezeptor-CTR1-Interaktion

Die Proteinkinase CTR1 stellt neben den Rezeptoren einen weiteren Negativregulator im Ethylensignalweg dar [15]. Durch Bindung von CTR1 an die Rezeptoren wird die Kinase in aktivem Zustand gehalten und sorgt für eine der Ethylenantwort durch Phosphorylierung von EIN2 [57,66]. Um mögliche Unterschiede zwischen den Regulationsmechanismen der einzelnen Rezeptoren aufzuklären, wurde die Bindung von CTR1 an ETR1 und ETR2 untersucht. CTR1 wurde dabei als CTR1-CFP-Fusionsprotein verwendet, um eine unspezifische Markierung mit einem Alexa-Farbstoff überflüssig zu machen. Da die CFP-Fluoreszenz jedoch nicht ausreichend für eine Verwendung in MST-Messungen war, musste das Protein doch noch zusätzlich mit dem Alexa488-Farbstoff markiert werden. Die ermittelten K_d -Werte für die Bindungen an ETR1 oder ETR2 waren mit 169 nM und 165 nM nahezu identisch (vgl. Abb. 3.13), was eine Bevorzugung und damit spezifische Regulation einer der beiden Rezeptoren ausschließt. Verglichen mit früheren Messungen der CTR1 – ETR1-Interaktion über Tryptophanfluoreszenzquench, bei denen Werte um ca. 3 μ M ermittelt wurden, sind die hier bestimmten Werte um etwa das 17-fache affiner [148]. Daran lässt sich zum einen erkennen, dass die Interaktion von CTR1 und den Ethylenrezeptoren deutlich stärker ist als bisher angenommen. Zum anderen scheint die doppelte Markierung von CFP1 mit CFP und dem Alexa-Farbstoff keinen störenden Einfluss auf die Interaktion zu haben. Dies wird durch Kontrollmessung mit denaturiertem ETR2 und CTR1 bestätigt, wobei keine Interaktion messbar war. Eine weitere mögliche Erklärung für den niedrigeren K_d -Wert stellt die Fusion von CTR1 an CFP dar, welche möglicherweise zur Stabilisierung des Proteins beiträgt. *Yeast-two-hybrid* und *in planta* Analysen deuten hingegen auf eine niedrigere Affinität von CTR1 zu dem Typ-II Rezeptor ETR2 hin. Die *Yeast-two-hybrid* Studien dazu wurden jedoch nicht quantifiziert und nur an isolierten Domänen der beteiligten Proteine durchgeführt [72,125]. Des Weiteren erfolgten die *in planta* durchgeführten Experimente unter Zugabe von Ethylen, dessen Einfluss in dieser Arbeit nicht genauer untersucht wurde [129]. Die mögliche ethyleninduzierte Regulation der Rezeptorinteraktionen mit CTR1 sollte in weiteren Experimenten charakterisiert werden.

4.2 Markierung des Membranproteins ETR1 mit dem Fluorophor FIAsh

Der Fluoreszenzfarbstoff FIAsh ist ein kleiner membranpermeabler Fluorophor, der zunächst zur Markierung von Proteinen in Zellkulturen verwendet wurde. Auch die Markierung von löslichen Proteinen konnte mit diesem Farbstoff, der spezifisch über Arsen(III)-Ionen an ein Tetracysteinmotiv bindet, bereits gezeigt werden [81]. Durch Einbringung dieses Sequenzmotivs in die Proteinsequenz ist die positionselektive Markierung eines Proteins möglich. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine solche selektive und positionsspezifische Markierung für isolierte Membranproteine etabliert werden.

Hierfür wurde ein optimiertes Tetracysteinmotiv an drei Positionen eingebracht, die im Bereich der Transmembrandomäne von ETR1 liegen (vgl. Abb. 3.14). Da sich eine der drei ETR1-Mutanten jedoch nicht exprimieren ließen (vgl. Abb. 3.15) wurden nur ETR1_FIAsh⁷⁴⁻⁸⁵ und ETR1_FIAsh¹²³⁻¹³² weiter analysiert. Eine spezifische Markierung dieser beiden Mutanten war vor Solubilisierung aus den *E. coli*-Membranen möglich. In vorherigen Analysen hatte sich gezeigt, dass die Zugabe von Detergenzien keine selektive Markierung zulässt, da sich der Farbstoff nicht von diesen abtrennen ließ. Des Weiteren führte eine Zugabe von Detergenzien zu einer detektierbaren Fluoreszenz von FIAsh, die normalerweise erst nach Bindung an das Tetracysteinmotiv zu Stande kommt [81,82]. Eine Reduktion von unspezifisch gebundenem Farbstoff war letztendlich erst durch Immobilisierung der ETR1-Mutanten, während der IMAC-Reinigung unter Zugabe von Ethandithiol möglich, welches mit dem Tetracysteinmotiv des Proteins um die Bindestellen von FIAsh konkurriert [82].

Die beiden Mutanten ETR1_FIAsh⁷⁴⁻⁸⁵ und ETR1_FIAsh¹²³⁻¹³² konnten mit leichten Verunreinigungen isoliert werden, welche jedoch auf Grund der deutlich geringeren Proteinmenge verglichen mit den beiden Mutanten vernachlässigbar sind (vgl. Abb. 3.16).

Die Analyse der FIAsh-Markierung erfolgte durch Aufnahme der Fluoreszenzspektren von beiden FIAsh-Mutanten im Vergleich mit dem wildtypischen ETR1 (vgl. Abb. 3.17). Hierbei zeigte ETR1_FIAsh¹²³⁻¹³² die höchste Fluoreszenzintensität und damit einhergehend die stärkste Markierung mit dem FIAsh-Farbstoff. Auch ETR1_FIAsh⁷⁴⁻⁸⁵ ließ sich erfolgreich mit FIAsh markieren, wenn auch in deutlich geringerem Ausmaß. ETR1 ließ sich unter den gleichen Bedingungen hingegen kaum markieren. Der Anteil von markiertem ETR1 machte

ca. 2,4 % gegenüber ETR1_FIAsh¹²³⁻¹³² und ca. 9.4 % gegenüber ETR1_FIAsh⁷⁴⁻⁸⁵ aus. Auf Grund dieser sehr geringen ETR1-Markierung kann von einer spezifischen Markierung der Mutanten ausgegangen werden. Um eine weitere Optimierung der Ergebnisse zu erzielen, kann eine Erhöhung der Ethandithiol-Konzentration zur Entfernung von unspezifisch gebundenen FIAsh getestet werden (vgl. 2.6). Die stärkere Markierung von ETR1_FIAsh¹²³⁻¹³² gegenüber ETR1_FIAsh⁷⁴⁻⁸⁵ kommt möglicherweise durch die Position der eingeführten Tetracysteinmotive zu Stande. Während diese in ETR1_FIAsh¹²³⁻¹³² im zytosolischen Bereich von ETR1 liegt, wurde diese in ETR1_FIAsh⁷⁴⁻⁸⁵ in einen *Loop* im Membranbereich eingefügt, welcher sich laut Vorhersage in der Pflanzenzelle normalerweise im ER-Lumen befindet (vgl. Abb. 3.14). Auf Grund dessen kann es zu einer unterschiedlichen Zugänglichkeit des Farbstoffes kommen.

Die Funktionalität der beiden Mutanten wurde über Interaktionsmessungen mit EIN2-CEND überprüft (vgl. Abb. 3.18). Für ETR1_FIAsh¹²³⁻¹³² ergab sich ein um den Faktor 10 höherer K_d -Wert verglichen mit Messungen an ETR1 (vgl. Abb. 3.9). Dies kann zum einen durch Strukturänderungen der ETR1-Mutante bedingt sein, welche einen Einfluss auf die native Faltung des Proteins nehmen können. Es ist aber auch möglich, dass das Tetracysteinmotiv im Bereich der Interaktionsfläche von ETR1 und EIN2 liegt und diese teilweise abschirmt. Die genauen Interaktionsflächen der beiden Proteine sind bisher nicht bekannt, eine Beteiligung der ETR1 GAF-Domäne und Kinase-Domäne konnte jedoch gezeigt werden [126,149]. Im Gegensatz hierzu konnte eine höhere Affinität von EIN2-CEND zu ETR1_FIAsh⁷⁴⁻⁸⁵ als zu ETR1 gemessen werden (vgl. Abb. 3.9). Da sich das Tetracysteinmotiv hierbei außerhalb des zytosolischen Bereiches von ETR1 befindet, kann für diese Mutante eine partielle Abschirmung der EIN2-Interaktionsfläche ausgeschlossen werden. Zusammenfassend konnte eine selektive Markierung der Rezeptoren und eine erfolgreiche Interaktionsmessung zwischen markiertem ETR1_FIAsh⁷⁴⁻⁸⁵ und EIN2-CEND durchgeführt werden, was die erfolgreiche Etablierung einer positionsspezifischen und selektiven Markierung von Membranproteins bedeutet.

Zudem ist hieran auch das große Potential der FIAsh-Markierung erkennbar. Zum einen können durch die selektive Markierung eines Membranproteins unspezifische Markierungen (wie z.B. die Markierung von Lysinen und Argininen über Amin-reaktive Alexa-Farbstoffe) vermieden werden. Zum anderen liefert die gezielte und

positionsspezifische FLAsH-Markierung die Möglichkeit dynamische Konformationsänderungen über FRET innerhalb von Membrandomänen zu messen [82].

4.3 *In vitro* Analyse der Rezeptor-Rezeptor-Komplexbildung

4.3.1 Quantifizierung der Rezeptor-Rezeptor-Komplexbildung über *Microscale Thermophoresis*

Zum Abschluss der durchgeführten MST-Messungen an isolierten Proteinen sollte die Frage der homo- und heteromeren Rezeptorinteraktionen untersucht werden. Dies wurde anhand der beiden Vollängenproteine ETR1 und ETR2 analysiert, wobei ETR2 in Form von GST-ETR2 verwendet wurde. Ein möglicher Einfluss des GST-Tags konnte jedoch bereits durch Gao *et al.* ausgeschlossen werden [46]. Zusätzlich wurde am Beispiel von ETR1 die Beteiligung der Rezeptortransmembrandomäne an der Interaktion genauer untersucht. Frühere Studien konnten zwar zeigen, dass die GAF-Domäne für homo- wie auch für heteromere Interaktionen eine tragende Rolle spielt, die Bedeutung der Transmembrandomäne wurde jedoch bisher nicht charakterisiert [46]. In der vorliegenden Arbeit wurde die ETR1-Transmembrandomäne mit einer Modifikation, bei der die beiden Cysteine an Position 4 und 6 gegen Serine ausgetauscht wurden, verwendet. Diese Aminosäuren sind *in vivo* für die kovalente homo-Dimerisierung von ETR1 verantwortlich [54], was für die weiteren Versuche ausgeschlossen werden sollte. Die isolierte ETR1-Transmembrandomäne (ETR1_TM) konnte mittels IMAC in hoher Reinheit isoliert werden und stand somit für die weiteren Versuche zur Verfügung (vgl. Abb. 3.19).

Für die durchgeführten Messungen wurden die jeweiligen Rezeptoren erneut mit dem Alexa-Farbstoff Alexa488 markiert. Für die unter 3.4.2 gezeigten Messungen von ETR1 und ETR2 zeigte sich, dass sowohl heteromere, als auch homomere Interaktionen gemessen werden konnten. Die K_d -Werte zeigten eine relativ geringe Spannweite, von 96 nM für die homomere ETR2-Interaktion über 177 bis 217 nM für die heteromeren Rezeptor-Interaktionen bis hin zu 326 nM für die homomere ETR1-Interaktion. Die Interaktion der Typ-II Rezeptoren (ETR2 – ETR2) ist hier um einen Faktor von ca. 3,4 niedriger als die der Typ-I Rezeptoren (ETR1 – ETR1). Diese relativ geringen Unterschiede der

Bindungskonstanten müssen bei der Beurteilung der Messungen berücksichtigt werden. So ist zum einen die deutliche Tendenz erkennbar, dass die homomere Typ-II Rezeptor-Bindung der heteromeren Interaktion mit ETR1 vorgezogen wird. Eine mögliche Erklärung für die beobachtete höhere Affinität der Typ-II Rezeptoren kann an der zusätzlichen Transmembranhelix der Typ-II Rezeptoren liegen. Diese besitzt möglicherweise eine stabilisierende Wirkung oder eine anderweitige Rolle in der Interaktion, anstatt wie bisher angenommen nur als Signalsequenz zu dienen [44]. Genauso zeigt ETR1 eine höhere Affinität zu ERT2 als zu sich selber, was bereits von Gao *et al.* für Typ-II Rezeptoren diskutiert wurde, dort aber aufgrund der Verwendung einer trunkierten Version von ERS2 nicht nachgewiesen werden konnte [46]. Die durchgeführten Bindungsstudien unter Verwendung der ETR1-Transmembrandomäne und ETR1 bzw. ETR2 zeigten K_d -Werte vergleichbarer Größenordnung zu den Vollängenproteinen. Somit reicht die ETR1-Transmembrandomäne bereits für eine nicht-kovalente Interaktion der Rezeptoren aus. Hierbei fällt der leicht erhöhte K_d -Wert der ETR1-TM – ETR1 Interaktion auf, was ebenfalls auf eine stabilisierende Funktion der zusätzlichen Helix hindeutet.

Generell wird die Beurteilung von K_d -Werten untereinander vereinfacht, je deutlicher sich diese unterscheiden. Zur Unterstützung der hier gemessenen Bindungsaffinitäten kann allerdings aufgeführt werden, dass auch in anderen Studien Affinitätsunterschiede in vergleichbarer Größenordnung gemessen wurden [73,150].

Weiterhin gilt es zu beachten, dass in diesen Analysen keine Aussage zu den jeweiligen Oligomerisierungszuständen der Rezeptoren getroffen werden kann. Frühere Studien haben bereits gezeigt, dass die Rezeptoren sowohl homo- als auch hetero-Dimere, aber auch höhere Oligomere bilden können [46,151]. Zudem können diese Oligomerisierungszustände konzentrationsabhängig auftreten [152,153]. Dies wäre besonders im Hinblick auf weiterführende Versuche zur Messung der Rezeptorinteraktionen, z. B. mittels SEC-MALS (*size exclusion chromatography – multi angle light scattering*), von Bedeutung. Bei dieser Methode wird über Kombination der Lichtstreuung unter Einsatz einer Größenausschlusschromatographie das Molekulargewicht von Molekülen bestimmt. Zudem kann hierbei der Anteil einzelner Proteine innerhalb eines Komplexes bestimmt werden [154]. Um etwaige konzentrationsabhängige Effekte zu erkennen, müssten die SEC-MALS Analysen in

verschiedenen Konzentrationen der Rezeptoren durchgeführt werden. Über chemisches Crosslinking wäre es zudem möglich oligomere Zustände, wie z.B. Dimere, zu simulieren und erneute Bindungsstudien mit diesen durchzuführen. Diese könnten dann im Vergleich mit den bereits durchgeführten Messungen einen weiteren Aufschluss über die Art der Rezeptor-Interaktionen bieten. Sollten allerdings über einen sehr engen Konzentrationsbereich verschiedene oligomere Zustände zu bestimmen sein, wäre dieses Vorgehen kaum anwendbar.

Des Weiteren wäre es sehr interessant zu untersuchen, inwieweit ethyleninduzierende Stimuli einen Einfluss auf eine mögliche Rezeptor-Oligomerisierung zeigen. Da sich gasförmiges Ethylen nur sehr schwer handhaben lässt, wäre es möglich Agonisten wie Cyanid oder 2,5-Norbornadiene zu verwenden [155,156]. Zudem wäre es wichtig, die Beteiligung weiterer Komponenten des Ethylensignalweges an der Rezeptor-Oligomerisierung zu untersuchen, da frühere Studien über Pulldown-Assay und Größenausschluss-chromatographie bereits Hinweise auf die Beteiligung weiterer Proteine lieferten, diese jedoch nicht näher charakterisiert wurden [151].

Abschließend ist festzuhalten, dass in dieser Arbeit erstmals eine genaue Quantifizierung der Rezeptor-Interaktionen untereinander anhand von isolierten Proteinen vorgenommen werden konnte, wobei die homomere ERT2-Interaktion der heteromeren ERT2-ERT1-Interaktion und der homomeren ERT1-Interaktion vorgezogen ist. Zudem konnte diese Arbeit eine direkte Beteiligung der Transmembrandomäne an der Rezeptor-Interaktion nachweisen, die somit nicht ausschließlich über eine kovalente Dimerisierung stattfindet.

4.3.2 Einfluss des Phosphorylierungsstatus der Rezeptoren auf die Rezeptor-Rezeptor-Interaktion

Als weiterer Aspekt der Rezeptor-Interaktionen wurde ein möglicher Einfluss der Rezeptor-Phosphorylierung auf die auftretenden Bindungen untersucht. Für ETR1 wurde in früheren Studien bereits gezeigt, dass Histidin 353 das Ziel von Autophosphorylierung ist [157]. Hierzu muss erwähnt werden, dass in durchgeführten *in vitro* Kinase-Assays trotz Mutation dieses Histidins zu Alanin weiterhin ein restliches Phosphorylierungssignal detektiert werden konnte, was die Existenz von weiteren Phosphorylierungsstellen einräumt [97,157].

Da für die hier durchgeführten Messungen mittels MST der Phosphorylierungszustand des Proteins bekannt sein muss, wurden Mutanten von ETR1 verwendet, bei welchen Histidin 353 entweder zu Alanin als konstitutiv dephosphorylierter Zustand, oder zu Glutamat zur Mimikrierung einer permanenten Autophosphorylierung, ausgetauscht wurde [49]. Die durchgeführten Versuche ergaben mit K_d -Werten von 245 nM für die Interaktion der Alanin- mit der Glutamat-Mutante und 330 nM für die homomere Interaktion der Alanin-Mutante Bindungskonstanten vergleichbarer Größe (vgl. Abb. 3.22). Hinzu kommt, dass die gemessenen K_d -Werte in ähnlicher Größenordnung wie die, der zuvor bestimmten ETR1-ETR1-Interaktion liegen. Somit ist durch Simulation der Histidin-Phosphorylierung von ETR1 kein deutlicher Einfluss auf die Affinität der homomeren Rezeptorinteraktion erkennbar.

Allerdings gibt es für die hier durchgeführten Versuche weitere Faktoren zu berücksichtigen. Wie bereits angedeutet, könnten trotz Mutation von Histidin 353 weitere mögliche Phosphorylierungsstellen in ETR1 existieren. Ob diese eine Auswirkung auf die Rezeptor-Interaktionen haben, kann in den hier durchgeführten Versuchen nicht beurteilt werden.

Außerdem muss die Mimikrierung einer Phosphorylierung durch Glutamat oder Aspartat stets als nicht gleichwertiger Ersatz zu einer Phosphorylgruppe angesehen werden. Nichtsdestotrotz konnte in Interaktionsstudien zwischen ETR1 und EIN2 bzw. AHP1 durch einen solchen Aminosäureaustausch deutliche Effekte gezeigt werden, was die Anwendbarkeit dieses Verfahrens belegt [70,73].

Ein weiterer Faktor, kann die Markierung mit dem Alexa-Farbstoff sein, welcher nicht selektiv an Arginin- und Lysin-Resten auftritt und somit eine partielle Abschirmung der Interaktionsfläche zwischen Proteinen zur Folge haben kann. Um einen Einfluss dieser unspezifischen Farbstoff-Markierung auszuschließen, wäre es möglich die in dieser Arbeit etablierte Markierung mit dem Farbstoff FIAsh einzusetzen und die Messungen hiermit zu wiederholen.

Bisher konnte außerdem die Bedeutung der Rezeptor-Autophosphorylierung für die Signalweiterleitung noch nicht abschließend geklärt werden. Studien legen bisher nahe, dass diese nicht für eine Signalweiterleitung erforderlich ist, wobei eine Rolle in der Signalmodulation mit anderen Komponenten wie beispielsweise EIN2 denkbar ist [73,158,159].

4.4 Kolokalisation der Ethylenrezeptoren am Endoplasmatischen Retikulum

Die *in vitro* Analysen der Ethylenrezeptoren aus *A. thaliana* über *Microscale Thermophoresis* konnten eine direkte Interaktion des Typ-I Rezeptors ETR1 mit dem Typ-II Rezeptor ETR2 nachweisen (vgl. 4.3.1). Die hohe Affinität der gemessenen Bindungen lassen auf eine hoch-spezifische Interaktion der beiden Rezeptoren schließen. Zusätzlich konnten zu den heteromeren Rezeptorinteraktionen auch homomere Interaktionen der einzelnen Rezeptoren (ETR2-ETR2 bzw. ETR1-ETR1) über MST nachgewiesen werden. Allerdings lassen keine dieser Ergebnisse Rückschlüsse auf den höheren Oligomerisierungszustand der Rezeptor-Komplexe zu. Ob es sich um Monomere, Dimere oder höhere Oligomere handelt, deren Interaktionen gemessen wurden, bleibt somit unklar.

Da die MST-Messungen an isolierten Rezeptoren durchgeführt wurden, sollte die Relevanz der detektierten Interaktion unter physiologischen Bedingungen bestätigt werden. Das dafür gewählte Expressionssystem *N. benthamiana* zeichnet sich durch eine breite Anwendbarkeit für Untersuchungen zur Proteinexpression, Proteinlokalisierung oder Protein-Protein-Interaktionen aus und kann in Kombination mit induzierbaren Promotoren in dieser Arbeit als geeignetes *in vivo* Modellsystem verwendet werden. Die Induktion der Proteinexpression ermöglicht es, diese zeitlich zu koordinieren und mögliche

Überexpressionen der Proteine zu verringern [160,161]. Wie bereits in Kapitel 3.5.1 erwähnt, konnten dennoch keine geeigneten Bedingungen für eine gemeinsame Expression der Rezeptoren ETR1 und ETR2 in *N. benthamiana* etabliert werden. Da Probleme bei der Proteinexpression häufig an der Größe der zu exprimierenden Proteine liegen, wurden anstelle dessen die Rezeptoren ERS1 und ERS2 als Vertreter der Typ-I bzw. Typ-II Rezeptoren verwendet. Diesen Rezeptoren fehlt im Gegensatz zu ETR1 und ETR2 die Antwort-Regulator-Domäne. Sie zeichnen sich allerdings durch eine hohe Sequenzhomologie zu ETR1 und ETR2 aus. So weisen ETR1 und ERS1 eine Sequenzidentität von 68 % und eine Ähnlichkeit von 81 % auf (vgl. Anhang 6.2.1). ETR2 und ERS2 als Vertreter der Typ-II Rezeptoren besitzen eine Sequenzidentität von 50 % und eine Ähnlichkeit von 65 % (vgl. Anhang 6.2.2).

Frühere Studien von Chen *et al.* und Grefen *et al.* konnten eine Lokalisation der *A. thaliana* Ethylenrezeptoren am Endoplasmatischen Retikulum zeigen [43,128]. Diese Lokalisation scheint jedoch nicht ausschließlich auf das ER beschränkt zu sein. Studien von Dong *et al.* konnten AtETR1 am Golgi-Apparat in *A. thaliana* Wurzelhaaren nachweisen. Zudem wurde für den Typ-II Rezeptor NTHK1 aus *N. tabacum* eine Lokalisation an der Plasmamembran gezeigt [162,163].

Zu Beginn dieser Arbeit wurde daher die intrazelluläre Lokalisation des Typ-II Rezeptors ERS2 für die späteren *in vivo* Interaktionsstudien untersucht. Hierfür wurde das Fusionsprotein ERS2-mVenus mit dem Farbstoff FM4-64 und mit mCherry-markierten Proteinen bekannter Lokalisation koexprimiert. Wie in Abb. 3.23 A-A'' zu sehen ist, konnte keine Kolo-kalisation von ERS2-mVenus mit dem Plasmamembran-Farbstoff FM4-64 detektiert werden. Zur spezifischen Markierung des Golgi-Apparates wurde die α -1,2-Mannosidase aus *Glycine max* mit mCherry (Golgi-mCherry) verwendet [102]. Die netzartigen Strukturen von ERS2-mVenus lassen sich klar von den punktierten Strukturen von Golgi-mCherry abgrenzen (vgl. Abb. 3.23 B-B''). Eine Lokalisation von ERS2 an der Plasmamembran und am Golgi-Apparat wurde somit ausgeschlossen. Um eine Lokalisation am ER beurteilen zu können, wurde ERS2-mVenus mit einem ER-Marker, sowie mit CLV2 koexprimiert. Der ER-Marker verfügt über ein Retentionssignal fusioniert an mCherry, wodurch er nach der Proteintranslation am ER verbleibt [164]. CLV2-mCherry, welches in Abwesenheit von CRN ebenfalls am ER lokalisiert, wurde zur zusätzlichen Identifizierung

einer ER-Lokalisation eingesetzt [100]. Mit beiden Proteinen konnte eine Lokalisation von ERS2 am ER gezeigt werden (vgl. Abb. 3.24 C-C'' und D-D''), wobei es zu einer partiellen Kolokalisation kam.

Somit konnte die Lokalisation des Rezeptors ERS2 am ER bestätigt werden. Zur weiteren Charakterisierung dieses Typ-II Rezeptors sollte weiterhin die Interaktion mit einem Typ-I Rezeptor analysiert werden. Hierfür wurde ERS2-mVenus in Kombinationen mit ERS1-mCherry, ERS2-mCherry und BTI2-mCherry koexprimiert und erneut die Lokalisation untersucht. Die Koexpressionen der beiden Ethylenrezeptoren zeigt, dass beide in netzartigen Strukturen lokalisieren und große Bereiche mit deutlicher Kolokalisation zeigen. Die Koexpression von zwei ERS2-markierten Proteinen zeigt hierbei im Gegensatz zu der Expression von ERS2 mit ERS1 die etwas ausgeprägtere Kolokalisation (vgl. Abb. 3.24 A-A'' und B-B''). Für das Protein BTI2 wurde bereits ebenfalls eine Lokalisation im ER gezeigt [165]. In Kombination mit ERS2 kann diese bestätigt werden, allerdings ist die detektierte Kolokalisation schwächer als zwischen den Ethylenrezeptoren untereinander (vgl. Abb. 3.24 C-C''). Eine mögliche Erklärung dafür könnte die Akkumulation der Proteine darstellen. Unvollständige Kolokalisationen konnten bei verschiedenen Interaktionspartnern, wie beispielsweise Proteinen des Hepatitis C Virus oder zwischen zwei Kortikoidrezeptoren von Hippocampus Neuronen gezeigt werden. Außerdem konnte bereits für die Interaktion des tau-Proteins und Ubiquitin gezeigt werden, dass es sich um eine unvollständige Kolokalisation handelt. So kolokalisieren nur 60 % des Tau-Signals mit Ubiquitin, während bei umgekehrter Markierung sogar nur 24 % des Ubiquitin-Signals mit Tau kolokalisieren, was eine Ubiquitin-Akkumulation unabhängig vom Tau-Protein zeigt [166–168]. Somit ergeben sich aus Kolokalisationsstudien lediglich Anhaltspunkte aber keine Bestätigungen möglicher Protein-Protein-Interaktionen.

4.5 Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen über die Fluoreszenzlebenszeit und Anisotropie

4.5.1 Quantifizierung der Fluoreszenzlebenszeit

Die Kollokalisierung der Ethylenrezeptoren ERS1 und ERS2 am Endoplasmatischen Retikulum konnte in dieser Arbeit über konfokale Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 3.5.1 und 4.4) und bestätigt somit frühere Studien von Grefen *et al.* [128].

Um eine putative Interaktion der beiden Ethylenrezeptoren an der ER-Membran nachzuweisen, wurden die Rezeptoren über *Fluorescence Lifetime Imaging* Mikroskopie (FLIM) analysiert. Bei dieser Methode wird die Fluoreszenzlebenszeit eines Donor-Fluorophors in einem Donor-Akzeptor-Paar analysiert. Kommen zwei Fluorophore bei einer Protein-Interaktion in eine definierte räumliche Nähe zueinander, den sogenannten Förster-Radius, wird ein Teil der Anregungsenergie des Donors strahlungslos auf den Akzeptor übertragen. Hierbei kommt zu einem FRET-Ereignis und die Lebenszeit des Donors wird verkürzt [89]. Ausgehend von der Fluoreszenzlebenszeit kann die FRET-Effizienz bestimmt und somit die gemessene Interaktion quantifiziert werden [90]. Eine genaue Berechnung des Abstandes der beiden Fluorophore ist zwar möglich, wäre im hier vorliegenden Fall allerdings ungenau und würde keine weitergehenden Informationen liefern.

Zunächst wurde die Lebenszeit von freiem mVenus bestimmt. Diese ist in Abb. 3.25 grafisch dargestellt und auf $2,96 \text{ ns} \pm 0,05 \text{ ns}$ bestimmt worden (vgl. Tab. 3.3). Diese ist vergleichbar mit der Lebenszeit von freiem GFP, welches in wässriger Lösung eine Lebenszeit von $2,9 \text{ ns}$ besitzt [169]. Durch Fusion an den Ethylenrezeptor ERS2 wurde die Lebenszeit ($2,90 \text{ ns} \pm 0,06 \text{ ns}$) nur geringfügig beeinflusst. Bei der Kollokalisierung der beiden Ethylenrezeptoren ERS2-mVenus und ERS1-mCherry konnte hingegen eine signifikante Reduktion (vgl. Abb. 3.26 und Tab. 3.3) der Lebenszeit von ERS2-mVenus um 342 ps auf $2,56 \text{ ns} \pm 0,06 \text{ ns}$ gemessen werden, woraus sich ein E_{FRET} von ca. 12 % ergab. Auch bei der Messung von ERS2-mVenus-mCherry als Positivkontrolle konnte eine signifikante Reduktion der mVenus-Lebenszeit um 607 ps auf $2,56 \text{ ns} \pm 0,09 \text{ ns}$ bestimmt werden, was einen E_{FRET} -Wert von ca. 21 % ergab. Die höhere FRET-Effizienz der Kontrollprobe zeigt eine effiziente Kopplung der Fluorophore durch eine günstige räumliche Anordnung an.

Der reduzierte FRET-Wert für die Interaktion zwischen ERS2 und ERS1 könnte somit ein Hinweis auf mögliche sterische Konflikte bei der Interaktion sein. Dies kann jedoch ohne weitere Strukturinformationen und eine genaue Kenntnis der Protein-Konformationen nicht sicher bestimmt werden.

Im Gegensatz zu den bisherigen Messungen konnte keine signifikante Reduktion der mVenus-Lebenszeit bei Messung der Negativkontrolle detektiert werden. Der ermittelte E_{FRET} lag dabei bei ca. 0,1 % (vgl. Tab. 3.3). Ein Energietransfer zwischen dem ER-ständigen Rezeptor BTI2 und ERS2 fand somit nicht statt. Das Fehlen von FRET-Ereignissen kann dennoch nicht zwangsläufig eine Interaktion der beteiligten Proteine ausschließen. Sollten die an sie gekoppelten Fluorophore nämlich räumlich sehr weit voneinander entfernt vorliegen und keine Energieübertragung zulassen, wäre trotz einer bestehenden möglichen Interaktion der Proteine kein FRET messbar. Somit kann eine Interaktion zwischen ERS2 und BTI2 aufgrund der FRET-Daten zwar nicht vollständig ausgeschlossen werden, die Messungen zeigen jedoch, dass eine Kollokalisierung der beiden Proteine an der ER-Membran alleine für das Auftreten von FRET nicht ausreicht. Umgekehrt sind nachgewiesene FRET-Ereignisse sehr wohl als Bestätigung einer direkten Protein-Protein-Interaktion zu werten, wie es im durchgeführten Experiment für ERS2 und ERS1 der Fall ist.

Somit konnte durch diese Experimente eine Interaktion des Typ-I Rezeptors ERS1 mit dem Typ-II Rezeptor ERS2 unter physiologischen Bedingungen quantifizierbar nachgewiesen werden. Somit ist eine Interaktion der Rezeptoren sowohl *in vitro* in isolierten Formen, als auch *in vivo* bei ER-Lokalisation der Rezeptoren nachgewiesen. Im Gegensatz zu den von Grefen *et al.* mittels *membrane recruitment assays* (MeRA) durchgeführten Kollokalisationsstudien ermöglichen die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Daten präzisere Aussagen zur Homo- bzw. Heteromerbildung. Das Prinzip des MeRA beruht darauf, dass ein mit RFP markiertes Protein in der ER-Membran verankert wird und die putativen zytosolischen Interaktionspartner durch GFP markiert werden. Findet nun eine Interaktion der Proteine statt, so kollokalisieren auch beide Fluoreszenzsignale. Die Art der Auswertung, über reine Kollokalisierung der Signale, stellt dabei einen wesentlichen Nachteil der Methode dar. Die diffuse zytosolische Verteilung von nicht interagierenden Proteinen erzeugt bereits einen nicht zu vernachlässigenden Teil an Kollokalisierung. Zwar nimmt bei der von Grefen *et al.* abgebildeten Interaktion zwischen ERS1 und ETR2 das diffuse

Fluoreszenzsignal im Zytosol deutlich ab, jedoch erfolgt keine Quantifizierung der gemessenen Interaktion, was hingegen in dieser Arbeit durch Messungen der FRET-Effizienzen erfolgte [128].

Ein weiterer Vorteil der in dieser Arbeit verwendeten Methode liegt darin, dass die Rezeptoren als Vollängenproteine exprimiert werden. Grefen *et al.* haben durch Deletion der Transmembrandomäne eines Rezeptors künstlich einen zytosolischen Interaktionspartner erzeugt, welcher im weiteren Verlauf rekrutiert werden kann. Die gemessenen Interaktionen bilden zwar reale Zustände ab, vernachlässigen jedoch die physiologische Lokalisierung beider Proteine, auf Grund der bei einem Interaktionspartner fehlenden Transmembrandomäne. Die in dieser Arbeit über FLIM detektierten Rezeptor-Rezeptor-Interaktionen von zwei membranständigen Rezeptoren sind daher insgesamt aussagekräftiger. Die Interaktionen wurden in der nativen Umgebung der Rezeptoren, in der ER-Membran, gemessen. Ebenfalls zu betrachten ist die in dieser Arbeit durchgeführte Kontrolle mit BT12, einem ebenfalls ER-ständigen Protein. Hier konnte zwar eine Kolokalisation der Proteine am ER gezeigt werden, jedoch konnte durch das Ausbleiben eines FRET-Ereignisses kein Anhaltspunkt für eine direkte Interaktion mit einem Ethylenrezeptorprotein gefunden werden.

In Grefen *et al.* wurde eine Kontrolle mit freiem GFP durchgeführt und die Interaktion über die visuelle Kolokalisation der Fluorophore beurteilt [128]. Hierbei spielt die Fluoreszenzintensität eine wichtige Rolle. Diese ist jedoch von verschiedenen Faktoren, wie beispielsweise der Proteinexpression (Fluorophor-Konzentration), Variationen in der Anregungsstärke oder Photobleichen abhängig. Dieses Problem wurde in der vorliegenden Arbeit durch Messung der Fluoreszenzlebenszeit gelöst, einer Methode die unabhängig von diesen Störfaktoren ist [83].

4.5.2 Analyse der homo- und heteromeren Interaktionen über Anisotropie

Zur genaueren Charakterisierung der ERS2-ERS1-Interaktion wurde der, durch die FLIM-Messungen, zusätzlich gemessene Parameter der Fluoreszenzpolarisation und somit die Anisotropie von mVenus verwendet. Im Gegensatz zu der bereits ausführlich erwähnten FLIM-Messung, bei der eine Energieübertragung zwischen verschiedenen Fluorophoren betrachtet wird (hetero-FRET), wird bei Messungen der Anisotropie zusätzlich die Energiemigration zwischen identischen Fluorophoren gemessen (homo-FRET) [120]. Über die Anisotropie lassen sich somit homo- und heteromere Interaktionen differenzieren.

Um eine Oligomerisierung der Rezeptoren beurteilen zu können, musste zunächst die Anisotropie des freien Donor-Fluorophors bestimmt werden. Für isoliertes mVenus ergab sich ein r -Wert von 0,29. Dieser Wert zeigt eine deutliche Abweichung von dem für freies GFP gemessenen Anisotropie von 0,325 [169]. Dieser Unterschied kann zum einen durch einen Depolarisationseffekt der Mikroskop-Optik oder auch durch geänderte Rotationseigenschaften des Fluorophors in der Pflanze erklärt werden [170]. Für die Aussagen, welche im weiteren Verlauf gezogen werden, kann dieser Unterschied jedoch vernachlässigt werden.

Wird nun ein Protein an das Fluorophor fusioniert, führt dies zur Einschränkung der Rotationsfreiheit des Fluorophors, wodurch der r -Wert ansteigen sollte. Die Messung der Anisotropie für ERS2-mVenus hat jedoch eine signifikante Reduktion verglichen mit isoliertem mVenus gezeigt (vgl. Abb. 3.27 und Tab. 3.4). Dies deutet auf einen Energietransfer zwischen identischen Fluorophoren hin, wie er bei homomeren Protein-Protein-Interaktionen vorkommt [171]. Da es sich bei den verwendeten Fluorophoren mVenus und mCherry um monomere Varianten handelt, welche nicht mehr in der Lage sind zu dimerisieren, sind auftretende Interaktionen allein auf die Beteiligung der daran fusionierten Proteine zurückzuführen [172,173]. Für ERS2 konnte somit eine homomere Interaktion zwischen ERS2-Molekülen nachgewiesen werden. Eine genauere Bestimmung der homo- und heteromeren Anteile dieser Interaktion ist zwar grundsätzlich möglich, setzt jedoch umfangreiche Kalibrierungsmessungen eines „künstlichen“ Homodimers aus ERS2-mVenus-mVenus voraus.

Beim Auftretendem von hetero-FRET hingegen ist ein Anstieg der Anisotropie zu messen [93]. Dies ist am deutlichsten bei der Positivkontrolle ERS2-mVenus-mCherry zu beobachten, für die eine Anisotropie von 0,31 bestimmt wurde (vgl. Tab. 3.4). Dieses Konstrukt ermöglicht den Energietransfer von zwei direkt miteinander fusionierten Fluorophoren. Außerdem können die fusionierten Fluorophore für sterische Hinderungen sorgen und so die Homo-Oligomerisierung von ERS2 und einen damit verbundenen Abfall der Anisotropie durch homo-FRET verhindern.

Für die Koexpression von ERS1 und ERS2 konnte ebenfalls ein Anstieg der Anisotropie gemessen werden (r von 0,29), welcher aber unter dem Wert der Positivkontrolle lag (vgl. Abb. 3.27 und Tab. 3.4). Diese Tatsache verdeutlicht das Auftreten von hetero-FRET zwischen den beiden Proteinen und untermauert die bereits durch die Messung der Lebenszeiten aufgestellten Hypothese einer direkten Protein-Protein-Interaktion der unterschiedlichen Rezeptortypen *in vivo*. Dass der Anisotropie-Wert hierbei unter dem der Positivkontrolle liegt, kann durch den größeren Abstand der beiden Fluorophore zueinander erklärt werden. Ebenso möglich ist, dass es erneut zu homo-FRET zwischen ERS2-Molekülen kommt, was eine Reduktion der Anisotropie bewirkt. Da der gemessene r -Wert für ERS2 mit ERS1 aber über dem von ERS2 alleine liegt, lässt vermuten, dass neben homo-FRET auch ein signifikanter Anteil hetero-FRET stattfindet

Bei Betrachtung der Messungen mit BT12 werden erneut die Ergebnisse der Lebenszeit-Messungen bestätigt, welche keine Hinweise auf eine Interaktion mit einem Ethylenrezeptor gezeigt haben. Der gemessene r -Wert für ERS2 in Kombination mit BT12 entspricht dem von ERS2 alleine. Hier ist kein signifikanter Unterschied (vgl. Abb. 3.27) feststellbar und lässt damit lediglich auf das Auftreten von homo-FRET unter ERS2 Molekülen schließen.

Abschließend lässt sich sagen, dass durch beide der hier verwendeten Methoden (*in vivo* Messung der Lebenszeit und Anisotropie) zum ersten Mal die folgenden Ergebnisse gewonnen werden konnten: Die beiden Rezeptoren ERS1 und ERS2 zeigen eine sicher nachgewiesene hetero- als auch homomere Interaktion in physiologischer Umgebung der ER-Membran.

4.6 Ausblick

Im Zuge dieser Arbeit konnte die Klasse der Typ-II Ethylenrezeptoren anhand von ETR2 und ERS2 besser charakterisiert und deren wichtige Rolle in der Signalweiterleitung eingeordnet werden. Verglichen mit ETR1 als Prototyp des Signalweges nimmt der Typ-II Ethylenrezeptoren ETR2 nicht wie bisher angenommen eine untergeordnete Rolle ein.

Dieser ist gleichermaßen an den zur Signalweiterleitung benötigten Interaktionen beteiligt, was durch vergleichbare Affinitäten der ETR1-EIN2 und ETR1-CTR1-Bindung belegt wurde. Zukünftige Experimente zur Identifikation der genauen Bindungsbereiche über Röntgenstrukturanalyse können weitere wichtige Information liefern. So wäre es durch Ko-Kristallisation von ETR1 oder ETR2 mit EIN2 oder CTR1 möglich die an der Bindung beteiligten komplexierenden Aminosäurereste zu identifizieren. Die so gewonnenen Einblicke können weitere Rückschlüsse auf die Signalweiterleitung ermöglichen.

Außerdem sollten die homo- und heteromeren Interaktionen der Typ-II Rezeptoren durch MST-Messungen am weiteren Beispiel von ERS2 untersucht werden. Dadurch kann die Hypothese, dass ETR1 als Typ-I Rezeptor generell eine höhere Affinität zu Typ-II Rezeptoren zeigt, untersucht werden. Zusätzlich kann geklärt werden, ob die homomeren ERS2-Interaktionen vergleichbar bevorzugt wie die homomeren ETR2-Interaktionen sind. Wäre dies der Fall, könnten die generell höheren Affinitäten der Typ-II Rezeptoren eventuell durch ihre zusätzliche Transmembranhelix begründet sein. Durch Deletion dieser Helix bei einem Typ-II Rezeptor und Messung der homomeren Interaktion kann deren Bedeutung weiter untersucht werden.

Zudem wäre es interessant die genauen oligomeren Zustände der einzelnen Rezeptoren über SEC-MALS zu charakterisieren. Sofern sich hierbei klar differenzierbare Oligomerisierungszustände ergeben, wäre eine Charakterisierung der einzelnen multimeren Komplexe möglich.

5 Literatur

1. Gray, W. M. Hormonal regulation of plant growth and development. *PLoS Biol.* **2**, e311 (2004).
2. Bishopp, A., Mähönen, A. P. & Helariutta, Y. Signs of change : hormone receptors that regulate plant development. *Development* **133**, 1857–1869 (2006).
3. Santner, A., Calderon-Villalobos, L. I. & Estelle, M. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 301–307 (2009).
4. Gazzarrini, S. & McCourt, P. Cross-talk in plant hormone signalling: what Arabidopsis mutants are telling us. *Ann. Bot.* **91**, 605–612 (2003).
5. Santner, A. & Estelle, M. Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature* **459**, 1071–1078 (2009).
6. Jun, J. H., Fiume, E. & Fletcher, J. C. The CLE family of plant polypeptide signaling molecules. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 743–755 (2008).
7. Stepanova, A. N., Yun, J., Likhacheva, A. V & Alonso, J. M. Multilevel Interactions between Ethylene and Auxin in Arabidopsis Roots. *Plant Cell* **19**, 2169–2185 (2007).
8. Arc, E., Sechet, J., Corbineau, F., Rajjou, L. & Marion-Poll, A. ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination. *Front. Plant Sci.* **4**, 1–19 (2013).
9. Girardin, J. P. Einfluß des Leuchtgases auf die Promenaden und Straßenbäume. *Jahresber. Agric. Chem.* **7**, 199–200 (1864).
10. Neljubow, D. Über die horizontale Nutation der Stengel von *Pisum sativum* und einiger anderer Pflanzen. *Pflanz. Beih. Bot. Zentralb.* **10**, 128–139 (1901).
11. Guzmán, P. & Ecker, J. R. Exploiting the triple response of Arabidopsis to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell* **2**, 513–523 (1990).
12. Beyer, E. M. A potent inhibitor of ethylene action in plants. *Plant Physiol.* **58**, 268–271 (1976).
13. Sagee, O., Goren, R. & Riov, J. Abscission of Citrus Leaf Explants. *Plant Physiol.* **66**, 750–753 (1980).
14. Abeles, F. B., Morgan, P. W. & Saltveit, M. E. Ethylene in Plant Biology. 2nd Edition. in *Academic Press, San Diego* (1992).
15. Kieber, J. J. & Ecker, J. R. Ethylene gas: it's not just for ripening any more! *Trends Genet.* **9**, 356–362 (1993).
16. ten Have, A. & Woltering, E. J. Ethylene biosynthetic genes are differentially expressed during carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) flower senescence. *Plant Mol. Biol.* **1**, 89–97 (1997).
17. Yang, S. F. & Hoffman, N. E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**, 155–189 (1984).

18. Penninckx, I. A. M. A., Thomma, B. P. H. J., Buchala, A., Métraux, J.-P. & Broekaert, W. F. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 2103–2113 (1998).
19. Bleeker, A. B. & Kende, H. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 1–18 (2000).
20. Cheong, J. & Choi, Y. Do. Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends Genet.* **19**, 409–413 (2003).
21. Bratsch, A. D. & Mack, H. J. Ethephon and mechanical topping influence growth, yield, and lodging of sweet corn. *HortScience* **25**, 291–293 (1990).
22. Rademacher, W. Plant Growth Regulators: Backgrounds and Uses in Plant Production. *J. Plant Growth Regul.* **34**, 845–872 (2015).
23. Adams, D. O. & Yang, S. F. Ethylene biosynthesis: Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, 170–174 (1979).
24. Amrhein, N. & Wenker, D. Novel inhibitors of ethylene production in higher plants. *Plant Cell Physiol.* **20**, 1635–1642 (1979).
25. Siegień, I. & Bogatek, R. Cyanide action in plants - From toxic to regulatory. *Acta Physiol. Plant.* **28**, 483–497 (2006).
26. Siefert, F., Kwiatkowski, J., Sarkar, S. & Grossmann, K. Changes in endogenous cyanide and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid levels during the hypersensitive response of tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves. *Plant Growth Regul.* **17**, 109–113 (1995).
27. McMahon Smith, J. & Arteca, R. N. Molecular control of ethylene production by cyanide in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* **109**, 180–187 (2000).
28. Blumenthal, S. G., Hendrickson, H. R., Abrol, Y. P. & Conn, E. E. Cyanide Metabolism in Higher Plants: III. THE BIOSYNTHESIS OF β -CYANOALANINE. *J. Biol. Chem.* **243**, 5302–5307 (1968).
29. Liang, X., Abel, S., Keller, J. A., Shen, N. F. & Theologis, A. The 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 11046–11050 (1992).
30. Barry, C. S. *et al.* Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato. *Plant J.* **9**, 525–535 (1996).
31. Jones, J. F. & Kende, H. Auxin-induced ethylene biosynthesis in subapical stem sections of etiolated seedlings of *Pisum sativum* L. *Planta* **146**, 649–656 (1979).
32. Cary, A. J., Liu, W. & Howel, S. H. Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiol.* **107**, 1075–1082 (1995).
33. Woeste, K. E., Vogel, J. P. & Kieber, J. J. Factors regulating ethylene biosynthesis in etiolated *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Physiol. Plant.* **105**, 478–484 (1999).

34. Lau, O.-L. & Yang, S. F. Inhibition of Ethylene Production by Cobaltous Ion. *Plant Physiol.* **58**, 114–117 (1976).
35. Botella, J. R., Arteca, R. N. & Frangos, J. A. A mechanical strain-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 1595–1598 (1995).
36. Vahala, J., Schlagnhauser, C. D. & Pell, E. J. Induction of an ACC synthase cDNA by ozone in light-grown *Arabidopsis thaliana* leaves. *Physiol. Plant.* **103**, 45–50 (1998).
37. Lashbrook, C. C., Tieman, D. M. & Klee, H. J. Differential regulation of the tomato ETR gene family throughout plant development. *Plant J.* **15**, 243–252 (1998).
38. Tieman, D. M. & Klee, H. J. Differential expression of two novel members of the tomato ethylene-receptor family. *Plant Physiol.* **120**, 165–172 (1999).
39. Hua, J. & Meyerowitz, E. M. Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **94**, 261–271 (1998).
40. Hua, J., Chang, C., Sun, Q. & Meyerowitz, E. M. Ethylene Insensitivity Conferred by *Arabidopsis* ERS Gene. *Science* **269**, 1712–1714 (1995).
41. Sakai, H. *et al.* ETR2 is an ETR1-like gene involved in ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 5812–5817 (1998).
42. Hua, J. *et al.* EIN4 and ERS2 are members of the putative ethylene receptor gene family in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 1321–1332 (1998).
43. Chen, Y. F., Randlett, M. D., Findell, J. L. & Schaller, G. E. Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **277**, 19861–19866 (2002).
44. Chen, Y. F. *et al.* Ligand-induced degradation of the ethylene receptor ETR2 through a proteasome-dependent pathway in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **282**, 24752–24758 (2007).
45. Schaller, G. E., Ladd, A. N., Lanahan, M. B., Spanbauer, J. M. & Bleecker, A. B. The ethylene response mediator ETR1 from *Arabidopsis* forms a disulfide-linked dimer. *J. Biol. Chem.* **270**, 12526–12530 (1995).
46. Gao, Z. *et al.* Heteromeric interactions among ethylene receptors mediate signaling in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **283**, 23801–23810 (2008).
47. Moussatche, P. & Klee, H. J. Autophosphorylation activity of the *Arabidopsis* ethylene receptor multigene family. *J. Biol. Chem.* **279**, 48734–48741 (2004).
48. Shakeel, S. N., Wang, X., Binder, B. M. & Schaller, G. E. Mechanisms of signal transduction by ethylene: Overlapping and non-overlapping signalling roles in a receptor family. *AoB Plants* **5**, plt010 (2013).
49. Scharein, B., Voet van Vormizeele, J., Harter, K. & Groth, G. Ethylene signaling: Identification of a putative ETR1-AHP1 phosphorelay complex by fluorescence spectroscopy. *Anal. Biochem.* **377**, 72–76 (2008).

50. Muday, G. K., Rahman, A. & Binder, B. M. Auxin and ethylene: collaborators or competitors? *Trends Plant Sci.* **17**, 181–195 (2012).
51. Wuriyangan, H. *et al.* The Ethylene Receptor ETR2 Delays Floral Transition and Affects Starch Accumulation in Rice. *Plant Cell* **21**, 1473–1494 (2009).
52. Rodríguez, F. I. *et al.* A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from Arabidopsis. *Science* **283**, 996–998 (1999).
53. Hirayama, T. *et al.* RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in Arabidopsis. *Cell* **97**, 383–393 (1999).
54. Schaller, G. E. & Bleecker, A. B. Ethylene-binding sites generated in yeast expressing the Arabidopsis ETR1 gene. *Science* **270**, 1809–1811 (1995).
55. Mayerhofer, H., Panneerselvam, S. & Mueller-Dieckmann, J. Protein kinase domain of CTR1 from Arabidopsis thaliana promotes ethylene receptor cross talk. *J. Mol. Biol.* **415**, 768–779 (2012).
56. Zhong, S., Lin, Z. & Grierson, D. Tomato ethylene receptor–CTR interactions: visualization of NEVER-RIPE interactions with multiple CTRs at the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Bot.* **59**, 965–972 (2008).
57. Ju, C. *et al.* CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 19486–19491 (2012).
58. Gao, Z. *et al.* Localization of the Raf-like Kinase CTR1 to the Endoplasmic Reticulum of Arabidopsis through Participation in Ethylene Receptor Signaling Complexes. *J. Biol. Chem.* **278**, 34725–34732 (2003).
59. Qiao, H., Chang, K. N., Yazaki, J. & Ecker, J. R. Interplay between ethylene, ETP1/ETP2 F-box proteins, and degradation of EIN2 triggers ethylene responses in Arabidopsis. *Genes Dev.* **23**, 512–521 (2009).
60. Bisson, M. M. A., Bleckmann, A., Allekotte, S. & Groth, G. EIN2, the central regulator of ethylene signalling, is localized at the ER membrane where it interacts with the ethylene receptor ETR1. *Biochem. J.* **424**, 1–6 (2009).
61. Alonso, J. M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S. & Ecker, J. R. EIN2, a Bifunctional Transducer of Ethylene and Stress Responses in Arabidopsis. *Science* **284**, 2148–2152 (1999).
62. Wen, X. *et al.* Activation of ethylene signaling is mediated by nuclear translocation of the cleaved EIN2 carboxyl terminus. *Cell Res.* **22**, 1613–1616 (2012).
63. Li, W. *et al.* EIN2-directed translational regulation of ethylene signaling in Arabidopsis. *Cell* **163**, 670–683 (2015).
64. Binder, B. M. *et al.* The Arabidopsis EIN3 binding F-Box proteins EBF1 and EBF2 have distinct but overlapping roles in ethylene signaling. *Plant Cell* **19**, 509–523 (2007).
65. Konishi, M. & Yanagisawa, S. Ethylene signaling in Arabidopsis involves feedback regulation via the elaborate control of EBF2 expression by EIN3. *Plant J.* **55**, 821–831 (2008).

66. Qiao, H. *et al.* Processing and subcellular trafficking of ER-tethered EIN2 control response to ethylene gas. *Science* **338**, 390–393 (2012).
67. Chang, K. N. *et al.* Temporal transcriptional response to ethylene gas drives growth hormone cross-regulation in Arabidopsis. *Elife* **2**, e00675 (2013).
68. Hwang, I., Chen, H. & Sheen, J. Two-component signal transduction pathways in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **129**, 500–515 (2002).
69. Lohrmann, J. & Harter, K. Plant two-component signaling systems and the role of response regulators. *Plant Physiol* **128**, 363–369 (2002).
70. Scharein, B. & Groth, G. Phosphorylation alters the interaction of the Arabidopsis phosphotransfer protein AHP1 with its sensor kinase ETR1. *PLoS One* **6**, e24173 (2011).
71. Hass, C. *et al.* The response regulator 2 mediates ethylene signalling and hormone signal integration in Arabidopsis. *EMBO J.* **23**, 3290–3302 (2004).
72. Cancel, J. D. & Larsen, P. B. Loss-of-Function Mutations in the Ethylene Receptor ETR1 Cause Enhanced Sensitivity and Exaggerated Response to Ethylene in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **129**, 1557–1567 (2002).
73. Bisson, M. M. A. & Groth, G. New insight in ethylene signaling: Autokinase activity of ETR1 modulates the interaction of receptors and EIN2. *Mol. Plant* **3**, 882–889 (2010).
74. Binder, B. M., O'Malley, R. C., Wang, W., Zutz, T. C. & Bleecker, A. B. Ethylene stimulates nutations that are dependent on the ETR1 receptor. *Plant Physiol.* **142**, 1690–1700 (2006).
75. Ludwig, C. Diffusion zwischen ungleich erwärmten Orten gleich zusammengesetzter Lösungen. *Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien Math.-Naturwiss.* **20**, 539 (1856).
76. Wienken, C. J., Baaske, P., Rothbauer, U., Braun, D. & Duhr, S. Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. *Nat. Commun.* **1**, 1–7 (2010).
77. Jerabek-Willemsen, M., Wienken, C. J., Braun, D., Baaske, P. & Duhr, S. Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. *Assay Drug Dev. Technol.* **9**, 342–353 (2011).
78. Seidel, S. A. I. *et al.* Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions. *Methods* **59**, 301–315 (2013).
79. Adams, S. R. *et al.* New biarsenical ligands and tetracysteine motifs for protein labeling in vitro and in vivo: Synthesis and biological applications. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 6063–6076 (2002).
80. Scheck, R. A. & Schepartz, A. Surveying protein structure and function using bis-arsenical small molecules. *Acc. Chem. Res.* **44**, 654–665 (2011).
81. Gaietta, G. *et al.* Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science* **296**, 503–507 (2002).
82. Hoffmann, C. *et al.* A FIAsh-based FRET approach to determine G protein-coupled receptor activation in living cells. *Nat. Methods* **2**, 171–176 (2005).

83. Suhling, K. *et al.* Fluorescence lifetime imaging (FLIM): Basic concepts and some recent developments. *Med. Photonics* **27**, 3–40 (2015).
84. Szmecinski, H. & Lakowicz, J. R. Fluorescence lifetime-based sensing and imaging. *Sensors Actuators B Chem.* **29**, 16–24 (1995).
85. Gadella, T. W. J., Jovin, T. M. & Clegg, R. M. Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM): Spatial resolution of microstructures on the nanosecond time scale. *Biophys. Chem.* **48**, 221–239 (1993).
86. Lakowicz, J. R. & Szmecinski, H. Fluorescence lifetime-based sensing of pH, Ca²⁺, K⁺ and glucose. *Sensors Actuators B Chem.* **11**, 133–143 (1993).
87. Gerritsen, H., Sanders, R., Draaijer, A., Ince, C. & Levine, Y. Fluorescence lifetime imaging of oxygen in living cells. *J. Fluoresc.* **7**, 11–15 (1997).
88. Förster, T. Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys.* **437**, 55–75 (1948).
89. Bambot, S. B., Sipior, J., Lakowicz, J. R. & Rao, G. Lifetime-based optical sensing of pH using resonance energy transfer in sol-gel films. *Sensors Actuators B Chem.* **22**, 181–188 (1994).
90. Biskup, C. *et al.* Multi-dimensional fluorescence lifetime and FRET measurements. *Microsc. Res. Tech.* **70**, 442–451 (2007).
91. Chan, F. T. S., Kaminski, C. F. & Kaminski Schierle, G. S. HomoFRET fluorescence anisotropy imaging as a tool to study molecular self-assembly in live cells. *ChemPhysChem* **12**, 500–509 (2011).
92. Vaknin, A. & Berg, H. C. Direct evidence for coupling between bacterial chemoreceptors. *J. Mol. Biol.* **382**, 573–577 (2008).
93. Warren, S. C., Margineanu, A., Katan, M., Dunsby, C. & French, P. M. W. Homo-FRET based biosensors and their application to multiplexed imaging of signalling events in live cells. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 14695–14716 (2015).
94. Miroux, B. & Walker, J. E. 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 (1996).
95. Koncz, C. & Schell, J. The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Mol. Gen. Genet.* **204**, 383–396 (1986).
96. Qu, F. & Morris, T. J. Efficient infection of *Nicotiana benthamiana* by Tomato bushy stunt virus is facilitated by the coat protein and maintained by p19 through suppression of gene silencing. *Mol. Plant Microbe Interact.* **15**, 193–202 (2002).
97. Voet van Vormizeele, J. H. Funktionelle und molekulare Charakterisierung des Ethylenrezeptorproteins ETR1 aus *A. thaliana*. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (2006).

98. Martin, B. R., Giepmans, B. N. G., Adams, S. R. & Tsien, R. Y. Mammalian cell-based optimization of the biarsenical-binding tetracysteine motif for improved fluorescence and affinity. *Nat. Biotechnol.* **23**, 1308–1314 (2005).
99. Förster, K. Klonierung, Expression und Reinigung der MAPKKKinase CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE1 (CTR1) aus *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (2009).
100. Bleckmann, A., Weidtkamp-Peters, S., Seidel, C. a M. & Simon, R. Stem cell signaling in *Arabidopsis* requires CRN to localize CLV2 to the plasma membrane. *Plant Physiol.* **152**, 166–176 (2010).
101. Saint-Jore-Dupas, C. *et al.* Plant N-glycan processing enzymes employ different targeting mechanisms for their spatial arrangement along the secretory pathway. *Plant Cell* **18**, 3182–3200 (2006).
102. Nelson, B. K., Cai, X. & Nebenführ, A. A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants. *Plant J.* **51**, 1126–1136 (2007).
103. Follo, C. & Isidoro, C. A fast and simple method for simultaneous mixed site-specific mutagenesis of a wide coding sequence. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **49**, 175–183 (2008).
104. Gibson, D. G. *et al.* Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* **6**, 343–345 (2009).
105. Hanahan, B. D. & Jessee, J. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol.* **204**, 63–113 (1991).
106. Voet van Vormizeele, J. & Groth, G. Ethylene controls autophosphorylation of the histidine kinase domain in ethylene receptor ETR1. *Mol. Plant* **1**, 380–387 (2008).
107. Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., B. A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. in *The Proteomics Protocols Handbook* (ed. Walker, J. M.) 571–607 (Humana Press, 2005).
108. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
109. Dyballa, N. & Metzger, S. Fast and sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteins in polyacrylamide gels. *J. Vis. Exp.* e1431 (2009).
110. Kelly, S. M., Jess, T. J. & Price, N. C. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta* **1751**, 119–139 (2005).
111. Corrêa, D. H. a & Ramos, C. H. I. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. *African J. Biochem. Res.* **3**, 164–173 (2009).
112. Perez-Iratxeta, C. & Andrade-navarro, M. A. K2D2: estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *BMC Struct. Biol.* **5**, 25 (2008).
113. Kessenbrock, M. & Groth, G. Circular Dichroism and Fluorescence Spectroscopy to Study Protein Structure and Protein–Protein Interactions in Ethylene Signaling. *Methods Mol. Biol.* **1573**, 141–159 (2017).

114. Provencher, S. W. & Glöckner, J. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* **20**, 33–37 (1981).
115. Johnson, W. C. Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures. *Proteins* **35**, 307–312 (1999).
116. Sreerama, N. & Woody, R. W. A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal. Biochem.* **209**, 32–44 (1993).
117. Vasilief, I. Qtiplot-Data Analysis and Scientific Visualisation. <https://www.qtiplot.com> (2011).
118. Weidtkamp-Peters, S. & Stahl, Y. The Use of FRET/FLIM to Study Proteins Interacting with Plant Receptor Kinases. *Methods Mol. Biol.* **1621**, 163–175 (2017).
119. Boens, N. *et al.* Fluorescence lifetime standards for time and frequency domain fluorescence spectroscopy. *Anal. Chem.* **79**, 2137–2149 (2007).
120. Sarkar, P., Koushik, S. V., Vogel, S. S., Gryczynski, I. & Gryczynski, Z. Photophysical properties of Cerulean and Venus fluorescent proteins. *J. Biomed. Opt.* **14**, 034047 (2009).
121. Rice, P., Longden, I. & Bleasby, A. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet.* **16**, 276–277 (2000).
122. Omasits, U., Ahrens, C. H., Müller, S. & Wollscheid, B. Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics* **30**, 884–886 (2014).
123. The UniProt Consortium. UniProt: The universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* **45**, D158–D169 (2017).
124. Schindelin, J. *et al.* Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
125. Clark, K. L., Larsen, P. B., Wang, X. & Chang, C. Association of the Arabidopsis CTR1 Raf-like kinase with the ETR1 and ERS ethylene receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 5401–5406 (1998).
126. Bisson, M. M. A. & Groth, G. New insight in ethylene signaling: Autokinase activity of ETR1 modulates the interaction of receptors and EIN2. *Mol. Plant* **3**, 882–889 (2010).
127. Binder, B. M. *et al.* Arabidopsis seedling growth response and recovery to ethylene. A kinetic analysis. *Plant Physiol.* **136**, 2913–2920 (2004).
128. Grefen, C. *et al.* Subcellular localization and in vivo interactions of the Arabidopsis thaliana ethylene receptor family members. *Mol. Plant* **1**, 308–320 (2008).
129. Shakeel, S. N. *et al.* Ethylene regulates levels of ethylene receptor/CTR1 signaling complexes in Arabidopsis thaliana. *J. Biol. Chem.* **290**, 12415–12424 (2015).
130. Wang, W. *et al.* Identification of important regions for ethylene binding and signaling in the transmembrane domain of the ETR1 ethylene receptor of Arabidopsis. *Plant Cell* **18**, 3429–3442 (2006).

131. Ma, B. *et al.* Subcellular localization and membrane topology of the melon ethylene receptor CmERS1. *Plant Physiol.* **141**, 587–597 (2006).
132. ReFED. A Roadmap to Reduce U.S. Food Waste by 20 Percent. *New York: Rockefeller Foundation*. https://www.refed.com/downloads/ReFED_Report_2016. (2016).
133. Blanke, M. M. Reducing ethylene levels along the food supply chain: A key to reducing food waste? *J. Sci. Food Agric.* **94**, 2357–2361 (2014).
134. Bleecker, A. B., Estelle, M. A., Somerville, C. & Kende, H. Insensitivity to Ethylene Conferred by a Dominant Mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Science* **241**, 1086–1089 (1988).
135. Komar, A. A., Lesnik, T. & Reiss, C. Synonymous codon substitution affects ribosome traffic and protein folding during in vitro translation. *FEBS Lett.* **462**, 387–391 (1999).
136. Cortazzo, P. *et al.* Silent mutations affect in vivo protein folding in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 537–541 (2002).
137. Thomas, J. G. & Baneyx, F. Divergent effects of chaperone overexpression and ethanol supplementation on inclusion body formation in recombinant *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **11**, 289–296 (1997).
138. Buchen, E. Crystallisation and functional studies with ethylene receptor ETR1. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (2011).
139. Rial, D. V. & Ceccarelli, E. A. Removal of DnaK contamination during fusion protein purifications. *Protein Expr. Purif.* **25**, 503–507 (2002).
140. Kessenbrock, M. *et al.* Novel Protein-Protein Inhibitor Based Approach to Control Plant Ethylene Responses: Synthetic Peptides for Ripening Control. *Front. Plant Sci.* **8**, 1528 (2017).
141. Deléage, G. & Geourjon, C. An interactive graphic program for calculating the secondary structure content of proteins from circular dichroism spectrum. *Comput. Appl. Biosci.* **9**, 197–199 (1993).
142. Manavalan, P. & Johnson, W. C. Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Anal. Biochem.* **167**, 76–85 (1987).
143. Dalie, B., Skaleris, D., Köhle, K., Weissbach, H. & Brot, N. Interaction of DnaK with ATP: Binding, hydrolysis and Ca²⁺-stimulated autophosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **166**, 1284–1292 (1990).
144. Wijekoon, C. J. K., Ukuwela, A. A., Wedd, A. G. & Xiao, Z. Evaluation of employing poly-lysine tags versus poly-histidine tags for purification and characterization of recombinant copper-binding proteins. *J. Inorg. Biochem.* **162**, 286–294 (2016).
145. Berridge, M. J. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signalin organelle. *Cell Calcium* **32**, 235–249 (2002).
146. Edel, K. H., Marchadier, E., Brownlee, C., Kudla, J. & Hetherington, A. M. The Evolution of Calcium-Based Signalling in Plants. *Curr. Biol.* **27**, R667–R679 (2017).

147. Tuteja, N. & Mahajan, S. Calcium signaling network in plants: An overview. *Plant Signal. Behav.* **2**, 79–85 (2007).
148. Scharein, B. Molekulare Charakterisierung der Interaktion der Sensor kinase ETR1 aus *Arabidopsis thaliana* mit nachgeschalteten Komponenten des Ethylensignalwegs. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (2012).
149. Milić, D. *et al.* Recognition motif and mechanism of ripening inhibitory peptides in plant hormone receptor ETR1. *Sci. Rep.* **8**, 3890 (2018).
150. Ford, B. *et al.* Characterization of Ras mutant with identical GDP- and GTP-bound structures. *Biochemistry* **48**, 11449–11457 (2009).
151. Chen, Y.-F. *et al.* Ethylene receptors function as components of high-molecular-mass protein complexes in *Arabidopsis*. *PLoS One* **5**, e8640 (2010).
152. Bhattacharya, A., Prajapati, R., Chatterjee, S. & Mukherjee, T. K. Concentration-dependent reversible self-oligomerization of serum albumins through intermolecular β -sheet formation. *Langmuir* **30**, 14894–14904 (2014).
153. Merten, J. A., Schultz, K. M. & Klug, C. S. Concentration-dependent oligomerization and oligomeric arrangement of LptA. *Protein Sci.* **21**, 211–218 (2012).
154. Slotboom, D. J., Duurkens, R. H., Olieman, K. & Erkens, G. B. Static light scattering to characterize membrane proteins in detergent solution. *Methods* **46**, 73–82 (2008).
155. Sisler, E. C., Goren, R. & Huberman, M. Effect of 2,5-norbornadiene on abscission and ethylene production in citrus leaf explants. *Physiol. Plant.* **63**, 114–120 (1985).
156. Solomos, T. & Laties, G. G. Similarities between the Actions of Ethylene and Cyanide Initiating the Climacteric and Ripening of Avocados. *Plant Physiol.* **54**, 506–511 (1974).
157. Gamble, R. L., Coonfield, M. L. & Schaller, G. E. Histidine kinase activity of the ETR1 ethylene receptor from *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 7825–7829 (1998).
158. Wang, K. L., Li, H. & Ecker, J. R. Ethylene Biosynthesis and Signaling Networks. *Plant Cell* **14**, 131–151 (2002).
159. Hall, B. P. *et al.* Histidine kinase activity of the ethylene receptor ETR1 facilitates the ethylene response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **159**, 682–695 (2012).
160. Zuo, J., Niu, Q. W. & Chua, N. H. An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant J.* **24**, 265–273 (2000).
161. Goodin, M. M., Zaitlin, D., Naidu, R. A. & Lommel, S. A. *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *Mol. Plant Microbe Interact.* **21**, 1015–1026 (2008).
162. Xie, C. *et al.* Serine/threonine kinase activity in the putative histidine kinase-like ethylene receptor NTHK1 from tobacco. *Plant J.* **33**, 385–393 (2003).

163. Dong, C.-H., Rivarola, M., Resnick, J. S., Maggin, B. D. & Chang, C. Subcellular co-localization of Arabidopsis RTE1 and ETR1 supports a regulatory role for RTE1 in ETR1 ethylene signaling. *Plant J.* **53**, 275–286 (2008).
164. Gomord, V. *et al.* The C-terminal HDEL sequence is sufficient for retention of secretory proteins in the endoplasmic reticulum (ER) but promotes vacuolar targeting of proteins that escape the ER. *Plant J.* **11**, 313–325 (1997).
165. Nziengui, H. *et al.* Reticulon-like proteins in Arabidopsis thaliana: Structural organization and ER localization. *FEBS Lett.* **581**, 3356–3362 (2007).
166. Rouille, Y. *et al.* Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. *J. Virol.* **80**, 2832–2841 (2006).
167. van Steensel, B. *et al.* Partial colocalization of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in discrete compartments in nuclei of rat hippocampus neurons. *J. Cell Sci.* **109**, 787–792 (1996).
168. Abisambra, J. F. *et al.* Tau accumulation activates the unfolded protein response by impairing endoplasmic reticulum-associated degradation. *J. Neurosci.* **33**, 9498–9507 (2013).
169. Swaminathan, R., Hoang, C. P. & Verkman, A. S. Photobleaching recovery and anisotropy decay of green fluorescent protein GFP-S65T in solution and cells: cytoplasmic viscosity probed by green fluorescent protein translational and rotational diffusion. *Biophys. J.* **72**, 1900–1907 (1997).
170. Thaler, C., Koushik, S. V., Puhl, H. L., Blank, P. S. & Vogel, S. S. Structural rearrangement of CaMKII α catalytic domains encodes activation. *PNAS* **106**, 6369–6374 (2009).
171. Gauthier, I. *et al.* Homo-FRET microscopy in living cells to measure monomer-dimer transition of GFP-tagged proteins. *Biophys. J.* **80**, 3000–3008 (2001).
172. Zacharias, D. A., Violin, J. D., Newton, A. C. & Tsien, R. Y. Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* **296**, 913–916 (2002).
173. Shaner, N. C. *et al.* Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* **22**, 1567–1572 (2004).

6 Anhang

6.1 Abkürzungen

| | |
|-----------------------|--|
| 2YT | <i>2x Yeast Extract and Tryptone</i> |
| ACC | 1-Aminocyclopropan-1-carboxylsäure |
| AHP | <i>Arabidopsis histidine-containing phosphotransfer protein</i> |
| Amp | Ampicillin |
| <i>A. millepora</i> | <i>Acropora millepora</i> |
| <i>A. thaliana</i> | <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| <i>A. tumefaciens</i> | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> |
| AOA | Aminooxyessigsäure |
| APS | Ammoniumperoxidsulfat |
| ARR | <i>Arabidopsis response regulator</i> |
| AS | Aminosäuren |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| AVG | Aminoethoxyvinylglycin |
| °C | Grad Celcius |
| CD | Cirkulardichroismus |
| CEND | C-terminale Domäne von EIN2 |
| CFP | Cyan fluoreszierende Protein |
| Ci | Curie (Zerfall pro Sekunde) |
| CM | Chloramphenicol |
| C-terminal | Carboxyterminal |
| CTR | <i>constitutive triple response</i> |
| Da | Dalton |
| ddH ₂ O | Doppelt demineralisiertes Wasser, sterilfiltriert und UV-entkeimt durch Milli-Q Wasserfilteranlage |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DTT | Dithiothreitol |
| EBF | EIN3-binding F-box |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EDT ₂ | Ethandithiol |
| EGTA | Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tatraessigsäure |
| EIL | <i>EIN3-like</i> |
| EIN | <i>ethylene insensitive</i> |

| | |
|-----------------------|---|
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| ERS | <i>ethylene response sensor</i> |
| ETP | <i>EIN2 targeting protein</i> |
| ETR | <i>ethylene resistant</i> |
| FIAsH | <i>Fluorescein arsenical hairpin binder</i> |
| FLIM | <i>Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy</i> |
| FM4-64 | <i>N</i> -(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(Diethylamino) Phenyl) Hexatrienyl) Pyridinium Dibromide |
| Fos-16 | Fos-Choline-16, n-Hexadecylphosphocholine |
| FRET | Förster-Resonanzenergietransfer |
| g | Gramm oder Zentrifugalkraft/Beschleunigung |
| GAF | <i>cGMP-specific phosphodiesterases adenyl cyclases, formate hydrogen lyase transcriptional activator</i> |
| Gen | Gentamicin |
| GmMan ¹⁻⁴⁹ | α -1,2-Mannosidase aus <i>Glycine max</i> |
| GST | Glutathion-S-Transferase |
| h | Stunde(n) |
| HRP | <i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase |
| IMAC | Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid |
| Kan | Kanamycin |
| K _d | Dissoziationskonstante |
| L | Liter |
| m | Meter |
| M | Molarität (mol/L) |
| MTA | Methylthioadenosin |
| mCerulean | Monomer des cyan fluoreszierenden Proteins |
| mCherry | Monomer des rot fluoreszierenden Proteins |
| min | Minute |
| mVenus | Monomer des gelb fluoreszierenden Proteins |
| MW | <i>molecular weight</i> , Molekulargewicht |
| <i>N. benthamiana</i> | <i>Nicotiana benthamiana</i> |
| NLS | <i>nuclear localization sequence</i> |
| Nramp | <i>Natural resistance-associated macrophage protein</i> |
| <i>N. tabacum</i> | <i>Nicotiana tabacum</i> |
| N-terminal | aminoterminal |

| | |
|-------------------|---|
| OD ₆₀₀ | gemessene optische Dichte bei 600 nm |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| Raf | <i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i> |
| RAN | <i>Response to agonist</i> |
| rpm | <i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute |
| Rif | Rifampicin |
| RT | Raumtemperatur |
| SAM | S-Adenosylmethionin |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SOPMA | <i>Self-optimized prediction method</i> |
| Spec | Spectinomycin |
| SV | Säulenvolumen |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| TBS | Tris gepufferte Kochsalzlösung |
| TB | <i>Terrific broth</i> |
| TBT | Tris gepufferte Kochsalzlösung mit Tween |
| TCEP | Tris(2-carboxyethyl)phosphin |
| TEMED | Tetramethylethyldiamin |
| TEV | <i>Tobacco etch virus</i> |
| TM | Transmembrandomäne |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| UV | Ultraviolett |

6.2 Aminosäuren-Sequenzvergleiche

Die Sequenzvergleiche wurden mit dem Smith-Waterman Algorithmus von EMBOSS durchgeführt [121]

6.2.1 AS-Sequenzvergleich von AtETR1 und AtERS1

Identität: 68 %

Ähnlichkeit: 81 %

| | | | |
|--------|-----|---|-----|
| AtETR1 | 1 | MEVCNCIEPQWPADLLMKYQYISDFFIAIAYFSIPLELIYFVKKSAVFP | 50 |
| | | . : : : . . : : . | |
| AtERS1 | 1 | MESCDCFETHVNQDDLLVKYQYISDALIALAYFSIPLELIYFVQKSAFFP | 50 |
| AtETR1 | 51 | YRWVLVQFGAFIVLCGATHLINLWTFTHSRTVALVMTTAKVLTAVVSCA | 100 |
| | | : : : . . . : . : . . . | |
| AtERS1 | 51 | YKWVLMQFGAFIILCGATHFINLWMFFMHKAVAIVMTIAKVSCAVVSCA | 100 |
| AtETR1 | 101 | TALMLVHIIPDLLSVKTRELF LKNKAAELDREMGLIRTQEETGRHVRLT | 150 |
| | | | |
| AtERS1 | 101 | TALMLVHIIPDLLSVKNRELF LKKKADELDRMGLILTQEETGRHVRLT | 150 |
| AtETR1 | 151 | HEIRSTLDRHTILKTTLVELGRTLALAEALWMPTRTGLELQLSYTLRHQ | 200 |
| | | . . : : . : : : . : . : | |
| AtERS1 | 151 | HGIRRTLDRHTILRRTLVELGKTLCEALWMP SQSGLYLQLSHTLSHK | 200 |
| AtETR1 | 201 | HPVEYTVPIQLPVINQVFGTSRAVKISPNPVARLRPVSGKYMLGEVVAV | 250 |
| | | : . : : : . . . : : : : : . . : . . : | |
| AtERS1 | 201 | IQVGSSVPINLPIINELFNSAQAMHIPHSCPLAKIGPPVGRYSPPEVSV | 250 |
| AtETR1 | 251 | RVPLLHLSNFQINDWPELSTKRYALMVLMLP SDSARQWHVHELELVEVVA | 300 |
| | | . : . : . : : : . : . . . | |
| AtERS1 | 251 | RVPLLHLSNFQGSWSDLSGKGYAIMVLILP TDGARKWRDHELELVENVA | 300 |
| AtETR1 | 301 | DQVAVALSHAAILEESMRARDLLMEQNVALDLARREAETAIRARNDFLAV | 350 |
| | | : . : . | |
| AtERS1 | 301 | DQVAVALSHAAILEESMHARDQLMEQN FALDKARQEAEMAVHARNDFLAV | 350 |
| AtETR1 | 351 | MNHEMRTPMHAI IALSSLLQETELTPEQRLMVETILKSSNLLATLMNDVL | 400 |
| | | : . : : : : : : | |
| AtERS1 | 351 | MNHEMRTPMHAI ISLSSLLLETELSPEQRVM IETILKSSNLVATLISDVL | 400 |
| AtETR1 | 401 | DLSRLEDGSLQLELGTFLNHLTLFREVNLNIKPIAVVKKLPITLNLAPDLP | 450 |
| | | : . . : . : : : . | |
| AtERS1 | 401 | DLSRLEDGSLLENEPFSLQAIFFEEVISLIKPIASVKKLSTNLILSADLP | 450 |
| AtETR1 | 451 | EFVVGDEKRLMQIILNIVGNAVKFSKQGSISVTALVTKSDT----RAADF | 496 |
| | | . : . : . : : : . : : . . : . . : | |
| AtERS1 | 451 | TYAIGDEKRLMQITILNIMGNAVKFTKEGYISIIASIMKPESLQELPSPEF | 500 |
| AtETR1 | 497 | FVVPTGSHFYLRVKVKDSGAGINPQDIPKIFTKFAQTQSLATRSSGGGSL | 546 |
| | | : : . : : . . . | |
| AtERS1 | 501 | FPVLSDSHFYLCVQVKDTGCGIHTQDIPLLFTKFVQPRGTQRNHSGGGL | 550 |
| AtETR1 | 547 | GLAISKR FVNLMEGNIWIESDGLGKGCTAIFDVKLGISERSNESKQS | 593 |
| | | : : : . . . : : : . . | |
| AtERS1 | 551 | GLALCKRFVGLMGGYMWIESEGLEK GCTASFIIRLGICNGPSSSSGS | 597 |

6.2.3 AS-Sequenzvergleich von AtETR1 und AtETR2

Identität: 39 %

Ähnlichkeit: 58 %

| | | | |
|--------|-----|--|-----|
| AtETR1 | 4 | CNCIEPQ---WPADELLMKYQYISDFFIAIAYFSIPLELIYFVKKSAVFP | 50 |
| | | .:. . .:.: :. .: . : : : : : : : : . . | |
| AtETR2 | 32 | CNCEDEGNSFWSTENIL-ETQRVSDFLIAVAYFSIPIELLYFVSCSNV-P | 79 |
| AtETR1 | 51 | YRWVLVQFGAFIVLCGATHLINLWTFTHSRTVALVMTTAKVLTAVVSCA | 100 |
| | | :: .:. . . : . : .:. .:.:.:. . . : : : : : | |
| AtETR2 | 80 | FKWVLFEFIAFIVLCGMTHLLHGWTYSAHPFRLMMAFTVFKMLTALVSCA | 129 |
| AtETR1 | 101 | TALMLVHIIPDLLSVKTRELFKNKAAELDREMGLIRTQEETGRHVRMLT | 150 |
| | | : .:.: : : : : : .:.: : : : : | |
| AtETR2 | 130 | TAITLITLIPLLLKVKVREFMLKKKAHELGREVGLILIKKETGFHVRMLT | 179 |
| AtETR1 | 151 | HEIRSTLDRHTILKTTLVELGRTLALAEELWMPTRTGLELQLSYTLRHQ | 200 |
| | | . .:. : : : : . : : .:. .:. : : : : .:. .:. .:. : .: | |
| AtETR2 | 180 | QEIRKSLDRHTILYTTLVELSKTLGLQNCVWMPNDGGTEMDLTHELRGR | 229 |
| AtETR1 | 201 | HPVEY---TVPIQLPVINQVFGTSRAVKISPNSPVARLRPVSGKYM-LGE | 246 |
| | | . . : .:.:.:.:.:.:.:.:.:. .:. .:. : : .:. .:. .: | |
| AtETR2 | 230 | G--GYGGSVSMEDLDVVRIRESEVNVLSVDSSIARASGGGGDVSEIGA | 277 |
| AtETR1 | 247 | VVAVRVPLLHLSNFQINDWPELSTKRYALMVLMLPDSARQWHVHELELV | 296 |
| | | . : : : .:. : . . : .:. : .:. . . . : : | |
| AtETR2 | 278 | VAAIRMPMLRVSDFN----GELS---YAILVCVLPGGTPRDWTYQEIEIV | 320 |
| AtETR1 | 297 | EVVADQVAVALSHAAI LEESMRARDLLMEQNVALDLARREAETAIRARN | 346 |
| | | : : : : . . : : : .:. : : : .:. . : : | |
| AtETR2 | 321 | KVVADQVTVALDHAHVLEESQLMREKLAEQNRALQMAKRDALRASQARNA | 370 |
| AtETR1 | 347 | FLAVMNHMRTPMHAI IALSSLLQETELTPEQRLMVETILKSSNLLATLM | 396 |
| | | .:. .:. . : : . . : : .:. . : : : . : : : . : : : | |
| AtETR2 | 371 | FQKTMSEGMRPMSI LGLLSMIQDEKLSDEQKMIVDTMVKTGNVMSNLV | 420 |
| AtETR1 | 397 | NDVLDLSRLEDGSLQLELGTFLNLHTLFREVLNLIKPIAVVKKLPITLNLA | 446 |
| | | . : :. :. : | |
| AtETR2 | 421 | GDSMD---VPDGRFGTEMKPFSLHRTIHEAACMARCLCLCNGIRFLVDAE | 467 |
| AtETR1 | 447 | PDLPEFVVGDEKRLMQIILNIVGNAVKFSK--QGS-----ISVTALVTK | 488 |
| | | . . : : . : : . : : : : : . . . : : | |
| AtETR2 | 468 | KSLPDNVVGDERRVQVILHIVGSLVKPRKRQEGSSLMFKVLKERGSLDR | 517 |
| AtETR1 | 489 | SDTRAA-----DFFVVP TGSHFYLRVKVKDSGAGINPQDIPKIF | 527 |
| | | . . :. . . .:. .:. . . . : : | |
| AtETR2 | 518 | SDHRWAAWRSPASSADGDVYI-----RFEMNVENDDSSS----QSFASVS | 558 |
| AtETR1 | 528 | TKFAQTQSLATRSSGGGSLG----LAISKRFVNLMEGNIWI--ESDGLGK | 571 |
| | | :.:.:.:.: : . : : . . : : . . . | |
| AtETR2 | 559 | SRDQEVGDV--RFSGGYGLGQDLSFGVCKKVVQLIHGNI SVVPGSDGSPE | 606 |
| AtETR1 | 572 | GCTAIFDVKLGISERSNESKQSGIPKVPaiprhn--FTGLKVLVMDENG | 619 |
| | | : : : : : . . . | |
| AtETR2 | 607 | TMSLLLRFRRRP SISVHGSSPAPDHHHP-HSNSLLRGLQVLLVDTND | 655 |
| AtETR1 | 620 | VSRMVKGLLVHLGCEVTTVSSNEECLRVV-----SHEHKVVFMDVCM | 662 |
| | | . : : : . : : . . : : : : : . : | |
| AtETR2 | 656 | SNRAVTRKLLLEKLGCDVTAVSSGFDCLTAIAPGSSSPSTSFQVVVLDLQM | 705 |

| | | | |
|--------|-----|---|-----|
| AtETR1 | 663 | PGVENYQIALRIHEKFTKQRHQRP LLVALSGNTDKSTKEKCMSFGLDGVL | 712 |
| | | ..:.. :: : ...: .. : : ...: :..: : ... : : : | |
| AtETR2 | 706 | AEMDGYEVAMRIRSR-----SWPLIVATTVSLDEEMWDKCAQIGINGVV | 749 |
| AtETR1 | 713 | LKPVSL-----DNIRDVL | 725 |
| | | . : : . ..: . : | |
| AtETR2 | 750 | RKPVVLRAMESELRRVL | 766 |

6.3 Messbedingungen in der *Microscale* Thermophorese

Tab. 6.1.: Messbedingung bei der MST-Messung von ETR1_{Alexa488} bzw. ETR2_{Alexa488} mit EIN2-CEND (vgl. Abb. 3.9 A)

| Parameter | ETR1 _{Alexa488} – EIN2-CEND | ETR2 _{Alexa488} – EIN2-CEND |
|------------------------|--|---|
| c (markiertes Protein) | 100 nM | 20 nM |
| c (Titrationspartner) | 0,98 nM – 2 µM | 0,98 nM – 2 µM |
| Inkubation | - | - |
| Puffer | 50 mM Tris/HCl pH 7,8; 300 mM NaCl; 5 % (w/v) Glycerin; 0,0075 % (w/v) Fos-16 | 25 mM Tris/HCl pH 7,8; 25 mM Hepes/NaOH pH 7,8; 300 mM NaCl; 5 % (w/v) Glycerin; 0,0075 % (w/v) Fos-16 |
| Kapillaren | Standard | Standard |
| LED-Stärke [%] | 20 | 60 |
| IR-Laser-Stärke [%] | 60 | 20 |
| Auswertungsmethode | T-jump | Photobleichen |

Tab. 6.2.: Messbedingung bei der MST-Messung von EIN2-CEND_{Alexa488} mit ETR1 bzw. ETR2 (vgl. Abb. 3.9 B)

| Parameter | EIN2-CEND _{Alexa488} – ETR1 | EIN2-CEND _{Alexa488} – ETR2 |
|------------------------|---|---|
| c (markiertes Protein) | 75 nM | 75 nM |
| c (Titrationspartner) | 1,95 nM – 4 µM | 1,95 nM – 4 µM |
| Inkubation | 5 min | 5 min |
| Puffer | 50 mM Tris/HCl pH 7,8; 300 mM NaCl; 5 % (w/v) Glycerin; 0,0075 % (w/v) Fos-16 | 25 mM Tris/HCl pH 7,8; 25 mM Hepes/NaOH pH 7,8; 300 mM NaCl; 5 % (w/v) Glycerin; 0,0075 % (w/v) Fos-16 |
| Kapillaren | Standard | Standard |
| LED-Stärke [%] | 60 | 60 |
| IR-Laser-Stärke [%] | 60 | 60 |
| Auswertungsmethode | T-jump | T-jump |

Tab. 6.3.: Messbedingung bei der MST-Messung von EIN2-CEND_{Alexa488} mit Ca²⁺ bzw. Mg²⁺ (vgl. Abb. 3.10)

| Parameter | EIN2-CEND _{Alexa488} – Ca ²⁺ /Mg ²⁺ |
|------------------------|--|
| c (markiertes Protein) | 100 nM |
| c (Titrationspartner) | 48,8 nM – 200 µM |
| Inkubation | 10 min |
| Puffer | 50 mM Tris/HCl pH 7,8; 300 mM NaCl; 5 % (w/v) Glycerin; 0,0075 % (w/v) Fos-16 |
| Kapillaren | Premium |
| LED-Stärke [%] | 50 |
| IR-Laser-Stärke [%] | 60 |
| Auswertungsmethode | Photobleichen |

Denaturierung von EIN2-CEND_{Alexa488} – Ca²⁺: EIN2-CEND_{Alexa488} mit 4 % (w/v) SDS und 40 mM DTT versetzt, 5 min bei 95 °C erhitzt, dann Zugabe der Ca²⁺-Verdünnungsreihe, der Puffer in der Messung enthielt somit zusätzlich 2 % (w/v) SDS und 20 mM DTT, Messung siehe Tab. 6.3.

Tab. 6.4.: Messbedingung bei der MST-Messung von EIN2-CEND_{Alexa488} mit ETR1 bzw. ETR2 unter Zugabe von Ca²⁺ (vgl. Abb. 3.11).

| Parameter | EIN2-CEND _{Alexa488} (Ca ²⁺) – ETR1 | EIN2-CEND _{Alexa488} (Ca ²⁺) – ETR2 |
|------------------------|--|---|
| c (markiertes Protein) | 75 nM (versetzt mit 70 µM Ca ²⁺) | 75 nM (versetzt mit 70 µM Ca ²⁺) |
| c (Titrationspartner) | 1,95 nM – 4 µM | 1,95 nM – 4 µM |
| Inkubation | EIN2-CEND _{Alexa488} mit Ca ²⁺ : 10 min Nach Zugabe von ETR1: 5 min | EIN2-CEND _{Alexa488} mit Ca ²⁺ : 10 min Nach Zugabe von ETR2: 5 min |
| Puffer | 50 mM Tris/HCl pH 7,8; 300 mM NaCl; 5 % (w/v) Glycerin; 0,0075 % (w/v) Fos-16 | 25 mM Tris/HCl pH 7,8; 25 mM Hepes/NaOH pH 7,8; 300 mM NaCl; 5 % (w/v) Glycerin; 0,0075 % (w/v) Fos-16 |
| Kapillaren | Standard | Standard |
| LED-Stärke [%] | 60 | 60 |
| IR-Laser-Stärke [%] | 60 | 60 |
| Auswertungsmethode | T-jump | T-jump |

Tab. 6.5.: Messbedingung bei der MST-Messung von CTR1-CFP_{Alexa488} mit ETR1 bzw. ETR2 (vgl. Abb. 3.13).

| Parameter | CTR1-CFP _{Alexa488} – ETR1 | CTR1-CFP _{Alexa488} – ETR2 |
|------------------------|---|---|
| c (markiertes Protein) | 50 nM | 20 nM |
| c (Titrationspartner) | 0,98 nM – 4 µM | 0,98 nM – 4 µM |
| Inkubation | 0 min | 10 min |
| Puffer | 50 mM Tris/HCl pH 7,8; 300 mM NaCl; 5 % (w/v) Glycerin; 0,0075 % (w/v) Fos-16 | 25 mM Tris/HCl pH 7,8; 25 mM Hepes/NaOH pH 7,8; 300 mM NaCl; 5 % (w/v) Glycerin; 0,0075 % (w/v) Fos-16 |
| Kapillaren | Standard | Premium |
| LED-Stärke [%] | 70 | 70 |
| IR-Laser-Stärke [%] | 60 | 60 |
| Auswertungsmethode | T-jump | T-jump |

Denaturierung von CTR1-CFP_{Alexa488} – ETR2: wie in Tab. 6.5 aufgeführt angesetzt und mit 2 % (w/v) SDS und 40 mM DTT versetzt, 5 min inkubiert, Messung siehe Tab. 6.5.

Tab. 6.6.: Messbedingung bei der MST-Messung von ETR1_FIAsh⁷⁴⁻⁸⁵ bzw. ETR1_FIAsh¹²³⁻¹³² mit EIN2-CEND (vgl. Abb. 3.18).

| Parameter | ETR1_FIAsh ⁷⁴⁻⁸⁵ – EIN2-CEND | ETR1_FIAsh ¹²³⁻¹³² – EIN2-CEND |
|------------------------|---|---|
| c (markiertes Protein) | 200 nM | 300 nM |
| c (Titrationspartner) | 1,22 nM – 2,5 µM | 1,95 nM – 8 µM |
| Inkubation | - | - |
| Puffer | 50 mM Tris/HCl pH 7,8; 300 mM NaCl; 10 % (w/v) Glycerin; 0,0075 % (w/v) Fos-16 | 50 mM Tris/HCl pH 7,8; 300 mM NaCl; 10 % (w/v) Glycerin; 0,0075 % (w/v) Fos-16 |
| Kapillaren | Standard | Standard |
| LED-Stärke [%] | 95 | 90 |
| IR-Laser-Stärke [%] | 60 | 60 |
| Auswertungsmethode | Thermophorese mit T-jump | Thermophorese mit T-jump |

Tab. 6.7.: Messbedingung bei der MST-Messung von ETR1_{Alexa488} mit ETR1 bzw. ETR2 (vgl. Abb. 3.20 A und C).

| Parameter | ETR1 _{Alexa488} – ETR1 | ETR1 _{Alexa488} – ETR2 |
|------------------------|---|---|
| c (markiertes Protein) | 20 nM | 20 nM |
| c (Titrationspartner) | 0,49 nM – 4 µM | 0,49 nM – 4 µM |
| Inkubation | - | 10 min |
| Puffer | 50 mM Tris/HCl pH 7,8; 300 mM NaCl; 5 % (w/v) Glycerin; 0,0075 % (w/v) Fos-16 | 25 mM Tris/HCl pH 7,8; 25 mM Hepes/NaOH pH 7,8; 300 mM NaCl; 5 % (w/v) Glycerin; 0,0075 % (w/v) Fos-16 |
| Kapillaren | Standard | Premium |
| LED-Stärke [%] | 60 | 60 |
| IR-Laser-Stärke [%] | 60 | 60 |
| Auswertungsmethode | T-jump | T-jump |

Denaturierung von ETR1_{Alexa488} – ETR1/ETR2: wie in Tab. 6.7 aufgeführt angesetzt und mit 2 % (w/v) SDS und 40 mM DTT versetzt, 5 min inkubiert, Messung siehe Tab. 6.7, dabei c(Titrationspartner): 0,49 nM – 2 µM.

Tab. 6.8.: Messbedingung bei der MST-Messung von ETR2_{Alexa488} mit ETR1 bzw. ETR2 (vgl. Abb. 3.20 B und D).

| Parameter | ETR2 _{Alexa488} – ETR1 | ETR2 _{Alexa488} – ETR2 |
|------------------------|---|---|
| c (markiertes Protein) | 20 nM | 20 nM |
| c (Titrationspartner) | 0,49 nM – 4 µM | 0,49 nM – 4 µM |
| Inkubation | 10 min | 10 min |
| Puffer | 25 mM Tris/HCl pH 7,8; 25 mM Hepes/NaOH pH 7,8; 300 mM NaCl; 5 % (w/v) Glycerin; 0,0075 % (w/v) Fos-16 | 50 mM Hepes/NaOH pH 7,8; 300 mM NaCl; 5 % (w/v) Glycerin; 0,0075 % (w/v) Fos-16 |
| Kapillaren | Premium | Premium |
| LED-Stärke [%] | 60 | 60 |
| IR-Laser-Stärke [%] | 60 | 60 |
| Auswertungsmethode | T-jump | T-jump |

Denaturierung von ETR2_{Alexa488} – ETR1/ETR2: wie in Tab. 6.8 aufgeführt angesetzt und mit 2 % (w/v) SDS und 40 mM DTT versetzt, 5 min inkubiert, Messung siehe Tab. 6.8, dabei c(Titrationspartner): 0,49 nM – 2 µM.

Tab. 6.9.: Messbedingung bei der MST-Messung von ETR1_{Alexa488} bzw. ETR2_{Alexa488} mit ETR1-TM (vgl. Abb. 3.21).

| Parameter | ETR1 _{Alexa488} – ETR1-TM | ETR2 _{Alexa488} – ETR1-TM |
|------------------------|---|---|
| c (markiertes Protein) | 20 nM | 20 nM |
| c (Titrationspartner) | 0,98 nM – 16 µM | 0,98 nM – 16 µM |
| Inkubation | - | 10 min |
| Puffer | 50 mM Tris/HCl pH 7,8; 300 mM NaCl; 5 % (w/v) Glycerin; 0,0075 % (w/v) Fos-16 | 25 mM Tris/HCl pH 7,8; 25 mM Hepes/NaOH pH 7,8; 300 mM NaCl; 5 % (w/v) Glycerin; 0,0075 % (w/v) Fos-16 |
| Kapillaren | Standard | Premium |
| LED-Stärke [%] | 60 | 60 |
| IR-Laser-Stärke [%] | 60 | 60 |
| Auswertungsmethode | T-jump | T-jump |

Denaturierung von ETR1_{Alexa488}/ETR2_{Alexa488} – ETR1-TM: wie in Tab. 6.9 aufgeführt angesetzt und mit 2 % (w/v) SDS und 40 mM DTT versetzt, 5 min inkubiert, Messung siehe Tab. 6.9, dabei c(Titrationspartner): 0,98 nM – 8 µM.

Tab. 6.10.: Messbedingung bei der MST-Messung von ETR1^{H353A}_{Alexa488} mit ETR1^{H353A} bzw. ETR1^{H353E} (vgl. Abb. 3.22).

| Parameter | ETR1 ^{H353A} _{Alexa488} – ETR1 ^{H353A} /ETR1 ^{H353E} |
|------------------------|--|
| c (markiertes Protein) | 20 nM |
| c (Titrationspartner) | 0,49 nM – 8 µM |
| Inkubation | - |
| Puffer | 50 mM Tris/HCl pH 7,8; 300 mM NaCl; 5 % (w/v) Glycerin; 0,0075 % (w/v) Fos-16 |
| Kapillaren | Standard |
| LED-Stärke [%] | 70 |
| IR-Laser-Stärke [%] | 60 |
| Auswertungsmethode | T-jump |

6.4 Oligonukleotide

Tab. 6.11.: Für *Round the horn site-directed* Mutagenese verwendete Primer (vgl. 2.2.3.2)

| Bezeichnung des Oligonukleotids | Sequenz | Funktion |
|---------------------------------|---|--|
| ETR1_FL43-54_for | GGCTGTTGTAAGACCTTCCTTGTTTCAGTTTGG TGCTTTTATCG | Einfügen der FIAsh-Sequenz an Position 43 bis 54 in ETR1 |
| ETR1_FL43-54_rev | CGGACAACACCACCTATGAAAGTAAATCAAC TCAAGAGGAATCG | |
| ETR1_FL74-85_for | TGTTGTAAGACCTTCGTGATGACTACCGCGA AGGTG | Einfügen der FIAsh-Sequenz an Position 74 bis 85 in ETR1 |
| ETR1_FL74-85_rev | GCCCGGACAACACCACCTATGTAAGTTAATA AGATGAGTTGCTCCAC | |
| ETR1_FL121-13_for | TGTATGGAGCCGATGGGATTGATTCGAACTC AG | Einfügen der FIAsh-Sequenz an Position 123 bis 132 in ETR1 |
| ETR1_FL121-13_rev | ACAGCCCGGACAACAGTTCAAGAAAAGCTCC CGAGTCTTAAC | |
| TEV-for | GAAAATCTGTATTTTCAGGGCCCGGGTGTGA AAGAAATC | Austausch der Thrombin-gegen TEV-Schnittstelle in pGEX-4T-1_ETR2 |
| TEV-rev | ATCCGATTTTGGAGG | |
| ETR2_C-term_ 10xHis-for II | GCATCATCATCATCATCATCATCATCACT GACTGACG | 10x His-Tag C-terminal an ETR2 angefügt in pGEX-4T-1_ETR2 |
| ETR2_C-term_ 10xHis-rev | AGCAGCTGATCGGCCTG | |
| EIN2-TEV-for | AATCTGTATTTTCAGGGCATGGCTAGCATGA ATGC | Austausch der Thrombin-gegen TEV-Schnittstelle in pET15b(+)_EIN2 ⁴⁷⁹⁻¹²⁹⁴ |
| EIN2-TEV-rev | TTCGCCGCTGCTGTGATG | |

Tab. 6.12.: Fürs Gibson-Assembly verwendete Primer (vgl. 2.2.3.3)

| Bezeichnung des Oligonukleotids | Sequenz | Funktion |
|--|--|--|
| gib_pAB119-GFP-for ColE1-rev | ATGGTGAGCAAGGGC CGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCG TTCGCTCC | Amplifikation des Vektor <i>Backbone</i> pABindFRET, Sequenzabschnitt mCherry bis ColE1 |
| ColE1-for gib-RB-rev | GGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATAC CTACAGCG GTGTTTGACAGGATATATTGGCGGGTAAAC | Amplifikation des Vektor <i>Backbone</i> pABindFRET, Sequenzabschnitt ColE1 bis RB |
| gib-RB-for gib-pAB119-rev | GTTTACCCGCCAATATATCCTGTCAAACAC TGTACAAACTTGTTGATAGCTTGGCG | Amplifikation des Vektor <i>Backbone</i> pABindFRET, Sequenzabschnitt RB bis attR1 |
| gib-pAB111-ERS2-for gib-pAB111-mVenus-rev | CAACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGC CCTCGCCCTTGCTCACCATCTTGTACAGCTCG TCCATGC | Amplifikation des Inserts ERS2-mVenus, dieses wurde zwischen attR1 und mCherry eingefügt |

Tab. 6.13.: Für pENTR/D-TOPO Klonierung verwendete Oligonukleotide (vgl. 2.2.3.4.1)

| Bezeichnung des Oligonukleotids | Sequenz | Funktion |
|---------------------------------|--|--|
| TOPO_ERS1-for TOPO_ERS1-rev | CACCATGGAGTCATGCGATTG CCAGTTCCACGGTCTG | Amplifikation des ERS1-Gens, um dieses in den pENTR/D-TOPO Vektor einzufügen |
| TOPO_ERS2-for TOPO_ERS2-rev | CACCATGTAAAGACATTGTTAGTCC GTGGCTAGTAGACGGAGGAGTTG | Amplifikation des ERS2-Gens, um dieses in den pENTR/D-TOPO Vektor einzufügen |

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich während meiner Promotion unterstützt und an mich geglaubt haben. Ein besonderer Dank geht an meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. G. Groth für das interessante Projekt, das in mich gesetzte Vertrauen, die Unterstützung und Motivation während meiner Promotion und dafür, dass deine Tür immer offensteht. Herrn Prof. Dr. M. Bott möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens danken. Ein ganz herzlicher Dank geht an das Team vom CAi – liebe Steffi, vielen Dank für deine Unterstützung bei der Durchführung der FLIM-Messungen und deine ausführlichen Erklärungen. Auch bei Sebastian und Thomas (viel Erfolg in deiner neuen Stelle in Münster) möchte ich mich für die Hilfestellung rund ums Mikroskopieren bedanken. Vielen Dank für das Ausleihen deines Schlüssels, Cornelius, ohne dem wären die Messungen am Mikroskop deutlich komplizierter geworden. Bei Yvonne und Rebecca möchte ich mich für die Unterstützung rund um die Tabak-Expressionen bedanken.

Ich danke allen Personen der gesamten Arbeitsgruppe, mit denen ich bereits so viele Jahre arbeiten durfte. Vielen Dank für den freundlichen Umgang und die entgegengebrachte Unterstützung. Alex - Ich bin wirklich froh, dass wir das gesamte Studium zusammen absolviert und auch die Promotionszeit gemeinsam in einem Institut verbracht haben. Vielen Dank für deine immer gern angenommenen Hilfestellungen. Kerstin & Nici – vielen Dank, dass ihr das Labor am Laufen haltet und immer hilfsbereit seid, wenn im Labor mal wieder etwas nicht läuft, wie es soll. Claudia & Lena – vielen Dank für die vielen Mittagessensstunden und die vielen anregenden Unterhaltungen. Dominik, Dominik und Alex – ich danke euch für die lustige Zeit im Labor, die anregenden Diskussionen und die Arbeit, die ihr mir in den letzten Wochen abgenommen habt. Sophia – du bist die beste Masterstudentin, die ich mir während des Zusammenschreibens wünschen konnte. Vielen Dank, dass du so selbstständig und motiviert arbeitest.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Familie. Vielen Dank Mama und Papa, dass ihr immer an mich geglaubt habt und immer hinter mir standet, egal welchen Weg ich auch nehmen wollte. Ich danke meinen Geschwistern – Till, Lena, Jan & Imke – Danke, dass ihr für mich da seid, wenn ich euch brauche. Ich liebe euch!

Ich möchte mich auch ganz herzlich bei Maritta & Dieter bedanken. Vielen Dank, dass ihr mich von Anfang an so unglaublich freundlich und herzlich in eurer Familie willkommen geheißen habt. Vielen Dank, dass ihr auch immer ein offenes Ohr für meine Probleme habt. Ihr seid wunderbare Schwiegereltern.

Mein größter Dank geht an Niklas – vielen Dank für deine Unterstützung in allem was ich tue. Ich danke dir, dass du mich so akzeptierst wie ich bin. Du gibst mir in jeder Situation den Rückhalt den ich brauche. Ich danke dir, dass du mein Fels in der Brandung bist, egal was passiert – Ich liebe dich von ganzem Herzen, Ehemann!

Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Die vorliegende Arbeit wurde von mir selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet. Zudem versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und diesem Promotionsverfahren kein gescheitertes Promotionsverfahren vorausgegangen ist.

Ort, Datum

Mareike Berleth