

**Kupfertransport und -koordinationschemie der
kupferbindenden Domäne des Ethylenrezeptors
ETR1**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Lena Müller

aus Bergisch Gladbach

Düsseldorf, November 2019

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

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

Berichterstatter:

1. Univ. Prof. Dr. Georg Groth
2. Univ. Prof. Dr. Holger Gohlke

Tag der mündlichen Prüfung: 30.01.2020

Eigenanteile der in der Dissertation „Kupfertransport und – koordinationschemie der kupferbindenden Domäne des Ethylenrezeptors ETR1“ enthaltenen Publikationen:

Schott-Verdugo, S., et al. (2019). "Structural Model of the ETR1 Ethylene Receptor Transmembrane Sensor Domain." *Scientific Reports* 9(1): 8869.

Durchführung von Experimenten, Analyse der Daten und Verfassen des Artikels:

- Klonierung, Proteinexpression und Reinigung
- Analyse von Kupferbindung und -stöchiometrie
- Strukturmodellvalidierung mittels Tryptophan-*Scanning*-Mutagenese

Hoppen, C., et al. (2019). "Soluble and membrane-bound protein carrier mediate direct copper transport to the ethylene receptor family." *Scientific Reports* 9(1): 10715.

Durchführung von Experimenten:

- Proteinexpression und -reinigung ETR1¹⁻¹⁵⁷
- Kupfertransferexperimente zwischen ATX1 bzw. CCH und ETR1¹⁻¹⁵⁷

„Das haben wir noch nie probiert, also geht es sicher gut.“

Pippi Langstrumpf

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	2
1 Einleitung	3
1.1 Pflanzenhormone.....	3
1.2 Das Pflanzenhormon Ethylen	5
1.3 Der Ethylensignalweg und seine Komponenten	6
1.3.1 Die Signalwahrnehmung	6
1.3.2 Die Signaltransduktion.....	12
1.4 Kupferkoordination in Proteinen	13
1.5 Nachweismethoden für Kupfer	14
1.6 Zielsetzung	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Material.....	17
2.1.1 Chemikalien.....	17
2.1.2 Geräte	17
2.1.3 Chromatographie- und Verbrauchsmaterialien.....	18
2.1.4 Antikörper	19
2.1.5 Konstrukte und Bakterienstämme.....	20
2.2 Molekularbiologische Methoden	20
2.2.1 <i>Round the horn site-directed</i> Mutagenese.....	20
2.2.2 Verknüpfung von DNA-Fragmenten nach <i>Gibson</i>	22
2.2.3 Agarosegelelektrophorese.....	24
2.2.4 DNA-Isolation aus einem Agarosegel.....	24
2.2.5 Vermehrung und Gewinnung von Plasmid-DNA	24
2.2.6 Bestimmung der DNA-Konzentration.....	25
2.2.7 Sequenzierung	25
2.3 Mikrobiologische Methoden	25
2.3.1 Nährmedien zur Kultivierung von <i>E. coli</i> - Zellen.....	25
2.3.2 Transformation mittels Hitzeschock.....	25
2.3.3 Heterologe Expression von ETR1 und Rezeptorvarianten	26
2.4 Proteinbiochemische Methoden	27
2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	27
2.4.2 Konzentrierung der Proteinproben	28

2.4.3 Überführen von Proteinen in eine neue Pufferlösung	28
2.4.4 SDS-PAGE und Färbung aufgetrennter Proteine mit kolloidalem Coomassie	28
2.4.5 <i>semidry</i> Westernblot und immunologische Detektion	30
2.5 Proteinreinigung.....	31
2.5.1 Zellaufschluss und Membranpräparation.....	31
2.5.2 Solubilisierung und Isolation der Sensordomäne von ETR1 und Mutanten	31
2.5.3 Größenausschlusschromatographie (SEC).....	33
2.5.4 Denaturierende Isolation und Renaturierung von ETR1 und Rezeptorvarianten	33
2.6 Proteincharakterisierung.....	34
2.6.1 Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie).....	34
2.6.2 Bindungsstudien der Sensordomäne von ETR1 mit dem löslichen Kupferchaperon ATX1	35
2.7 Interaktionsstudien von Ethylenrezeptoren mit monovalentem Kupfer	36
2.7.1 Kupferbindung und Affinität	36
2.7.2 Untersuchung der Kupferstöchiometrie	36
2.7.3 Analyse der Kupferbindung und -koordinationschemie	37
2.7.4 Kupfertransferstudien von löslichen Kupferchaperonen zur Sensordomäne von ETR1	37
3 Ergebnisse.....	39
3.1 Heterologe Expression und Reinigung von ETR1-Rezeptorvarianten	39
3.2 Molekulare Charakterisierung der Sensordomäne von ETR1.....	42
3.2.1 Analyse der Sekundärstrukturelemente.....	42
3.2.2 Bindungsstudien der Sensordomäne von ETR1 mit ATX1	44
3.3 Kupferbindung und -stöchiometrie	45
3.4 Analyse der Kupferbindung mittels EPR-Spektroskopie	50
3.5 Kupfertransferstudien der Kupferchaperonen ATX1 und CCH sowie Nter-RAN1 zu ETR1_TMD	52
3.5.1 Kupferbeladung der Sensordomäne von ETR1.....	56
3.6 Analyse der Kupferkoordinationschemie in ETR1_TMD mittels Röntgenabsorptionsspektroskopie (XAS).....	58

3.7 Experimentelle Strukturmodellvalidierung mittels Tryptophan-Scanning-Mutagenese.....	62
4 Diskussion.....	65
4.1 Heterologe Expression und Reinigung von ETR1-Rezeptorvarianten	65
4.2 Molekulare Charakterisierung der Sensordomäne von ETR1.....	66
4.2.1 Analyse der Sekundärstrukturelemente.....	66
4.2.2 Bindungsstudien der Sensordomäne von ETR1 mit ATX1.....	67
4.3 Kupferbindung und -stöchiometrie.....	68
4.4 Analyse der Kupferbindung mittels EPR-Spektroskopie.....	72
4.5 Kupfertransferstudien der Kupferchaperonen ATX1 und CCH sowie Nter-RAN1 zu ETR1_TMD.....	74
4.6 Analyse der Kupferkoordinationschemie in ETR1_TMD mittels Röntgenabsorptionsspektroskopie (XAS).....	77
4.7 Experimentelle Strukturmodellvalidierung mittels Tryptophan-Scanning-Mutagenese.....	80
4.7.1 Die Kupferbindung von ETR1 im Kontext des Strukturmodells der Transmembrandomäne.....	82
4.8 Fazit und Ausblick.....	84
6 Literaturverzeichnis.....	86
7 Anhang.....	98
7.1 Abbildungsverzeichnis.....	98
7.2 Abkürzungsverzeichnis.....	99
7.3 Konstrukte und Vektorkarten.....	103
7.3.1 Verwendete Plasmid-Konstrukte.....	103
7.3.2 pET16b_ETR1_TMD.....	105
7.3.3 pET15b_ETR1_W7X.....	106
7.3.4 pET15b_ETR1_TMD_Th6xHis.....	107
7.4 Oligonukleotide.....	108
7.5 Aminosäuresequenz von ETR1.....	110
7.6 Separation von der Proteine nach einem Kupfertransfer.....	111
7.6.1 Separation von ATX1 und ETR1_TMD.....	111
7.6.2 Separation von Nter-RAN1 und ETR1_TMD.....	112
Danksagung.....	113
Versicherung.....	115

Zusammenfassung

Das Pflanzenhormon Ethylen nimmt auf viele Prozesse in Pflanzen Einfluss. Dazu zählen unter anderem die Fruchtreifung und die Seneszenz. Ein Ethylensignal wird in *Arabidopsis thaliana* von fünf ER-membranständigen Rezeptorkinasen, zu denen auch *ethylene response 1* (ETR1) zählt, wahrgenommen und bis in den Zellkern weitergeleitet. Dort kann dann eine Ethylenantwort ausgelöst werden. Die Ethylenwahrnehmung und die Aktivität der Ethylenrezeptoren ist dabei maßgeblich von einem Kupfer(I)-Kofaktor, der in die Transmembrandomäne integriert werden muss, abhängig.

Die Untersuchung des Kupfer(I)-Kofaktors und dessen Bindung an ETR1 steht im Focus dieser Arbeit. Dazu wurden die Kupferbindungsaffinität und die Kupfer-Protein-Stöchiometrie bestimmt und der Kupfertransfer auf die Sensordomäne des Rezeptors ETR1 analysiert. Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit befasst sich mit der Validierung eines mittels *ab initio* Strukturvorhersagen und koevolutionären Informationen generierten Strukturmodells der Transmembrandomäne von ETR1.

Dazu wurden Rezeptorvarianten von ETR1 in *E. coli* heterolog exprimiert und anschließend mittels Metallionen-Affinitätschromatographie isoliert. Um die isolierten Proteine weiterführend auf ihre Faltung und Funktionalität zu überprüfen, wurden CD-Spektren aufgezeichnet, Interaktionsstudien mittels *Microscale* Thermophorese durchgeführt und die Kupferbindung untersucht. Die Untersuchung der Kupferbindung an die rekombinanten Proteine liefert Hinweise dafür, dass neben dem bereits bekannten Kupfer(I)-Kofaktor ebenfalls Kupfer(II)-Ionen an die Transmembrandomäne von ETR1 binden.

Der Transfer von Kupfer(I)-Ionen auf die Transmembrandomäne von ETR1 konnte mit Hilfe der pflanzlichen, kupferbeladenen Chaperone CCH und ATX1 sowie der N-Terminus der P-Typ ATPase RAN1 nachgewiesen werden. Gleichzeitig bleibt der Kupfertransfer aus, wenn eine Rezeptorvariante von ETR1 verwendet wird, die durch Mutation der Reste C65 und H69 keine Ethylenbindungsaktivität mehr besitzt. Ebenfalls ist kein Kupfertransfer zu beobachten, wenn ein für das humane ATX1-Homolog beschriebener Inhibitor DC_AC50 verwendet wird.

Summary

The plant hormone ethylene is involved in many plant developmental processes such as fruit ripening or senescence. In *Arabidopsis thaliana* the ethylene signal is perceived by a small family of ER bound membrane receptor kinases. One of these receptors is named ethylene response 1 (ETR1). The perceived ethylene signal is transferred into the nucleus where it triggers the ethylene responses. Ethylene perception and receptor activity critically depend on a copper(I) cofactor integrated into the transmembrane domain of the ethylene receptors.

The focus of this work is the analysis of the copper(I) cofactor and its binding to ethylene receptor ETR1. To this end the copper binding affinity and copper-protein stoichiometry as well as the copper transfer of the transmembrane domain of ETR1 was investigated. In addition, the validation of the first structural model of the transmembrane domain of ETR1 is presented here. It was generated by combining *ab initio* structure predictions and coevolutionary information.

Ethylene receptor variants of ETR1 were heterologous expressed in *E. coli* and isolated from the bacterial host by metal ion affinity chromatography. Folding and functionality of receptor variants were analysed by CD spectroscopy, protein-protein interaction studies by microscale thermophoresis and copper binding studies. These studies suggest copper(II) binding of ETR1 in addition to copper(I) binding.

The transfer of copper(I) to the transmembrane domain of ETR1 was demonstrated by using copper loaded plant chaperons CCH and ATX1 as well as the N-terminal part of the P-type ATPase RAN1. No copper transfer was observed when a receptor variant with mutations at the positions C65 and H69 was used. Also, no copper transfer occurred when copper loaded chaperons were incubated with DC_AC50 which was shown to inhibit the copper transfer of the humane chaperon homolog to its target protein.

1 Einleitung

1.1 Pflanzenhormone

Bei Pflanzen handelt es sich um sessile – an einen festen Standort gebundene - Organismen. Diese Lebensform verlangt nach einem streng regulierten und fein justierten System, um sich an ständig wechselnde Umweltbedingungen anzupassen. In Pflanzen werden daher zahlreiche Prozesse hinsichtlich Wachstum und Entwicklung über Pflanzenhormone – auch Phytohormone genannt – gesteuert (Wang und Irving 2011).

Bereits in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts wurden die ersten Ideen bezüglich „organbildender Stoffe“ von Julius Sachs ausgearbeitet. Zusammen mit Erkenntnissen von Charles Darwin wurde der Anstoß zur Erforschung der uns jetzt bekannten Pflanzenhormone gegeben (Darwin 1880, Sachs 1880-82, Addicott 1957). In der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurden die pflanzlichen Hormone Auxin, Cytokinin, Gibberillin, Abscisinsäure und Ethylen identifiziert. Sie werden als die fünf klassischen Pflanzenhormone bezeichnet. Darüber hinaus zählen heute allerdings noch weitere Stoffgruppen dazu: Brassinosteroide, Salizylsäure, Jasmonate, Strigolactone und Stickstoffmonoxid (Santner und Estelle 2009). Abbildung 1.1 zeigt eine Übersicht über die fünf klassischen, sowie die fünf zusätzlichen Pflanzenhormone und deren Strukturformel.

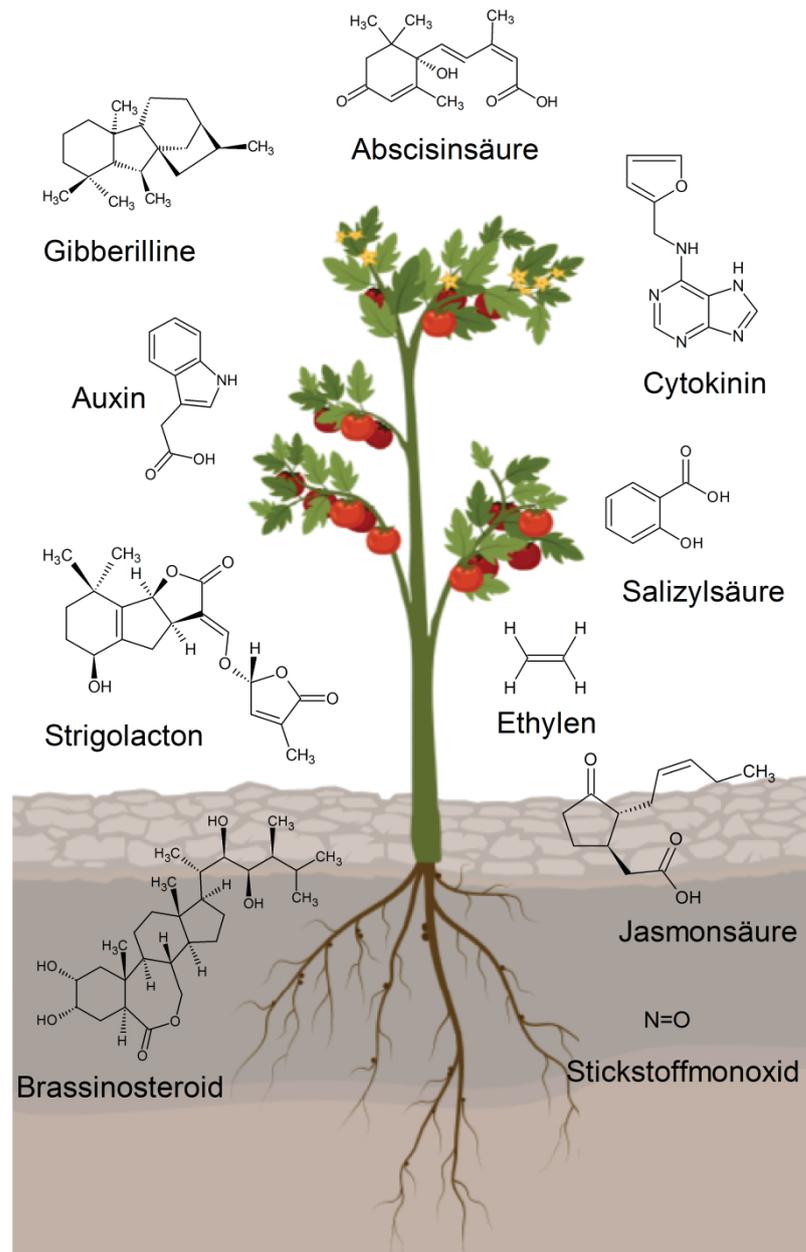


Abb. 1.1: Pflanzenhormone. Die Abbildung zeigt eine Übersicht über die Strukturformeln der fünf klassischen Pflanzenhormone (Auxin, Cytokinin, Gibberilline, Abscisinsäure und Ethylen), sowie den zusätzlichen, später ebenfalls als Pflanzenhormone identifizierten Stoffklassen der Brassinosteroide, Jasmonate, Strigolactone, Salizylsäure und Stickstoffmonoxid (Abbildung erstellt mit BioRender).

Das vermutlich größte Wirkungsspektrum bietet Auxin. Es ist in nahezu alle Aspekte hinsichtlich Wachstum, Entwicklung und Abwehr involviert. Cytokinin dagegen nimmt hauptsächlich auf die Zellteilung, z. B. bei der Samenkeimung, Einfluss. Gibberillin ist als Wachstumsregulator bekannt, während Jasmonat Stressantworten vermittelt (Santner, Calderon-Villalobos et al. 2009). Die Wirkungsweise dieser Hormone ist sehr komplex. Die

Aktivität eines jeden pflanzlichen Hormons wird durch seine Verfügbarkeit bedingt. Diese wiederum ist durch die Effektivität der Wahrnehmung und Signalweiterleitung reguliert (Vanstraelen und Benková 2012). Allerdings agieren Pflanzenhormone nicht unabhängig voneinander. Die gegenseitige Beeinflussung und das daraus resultierende Netzwerk der Kommunikation bietet ein großes regulatorisches Potential und werden als *cross talk* bezeichnet (Pieterse, Leon-Reyes et al. 2009).

1.2 Das Pflanzenhormon Ethylen

Das Pflanzenhormon Ethylen ist ein kleines gasförmiges Kohlenwasserstoffmolekül, das vor allem für seine Rolle in der Fruchtreifung bekannt ist. Darüber hinaus aber ist es in viele weitere Wachstums- und Entwicklungsprozesse von Pflanzen involviert. Dazu zählen z. B. Seneszenz, Abszission, Samenkeimung oder Zellelongation (Abeles, Morgan et al. 1992). Abbildung 1.2 zeigt den Einfluss von Ethylen auf den Seneszenzprozess einer Schnittblume am Beispiel einer Rosenblüte.

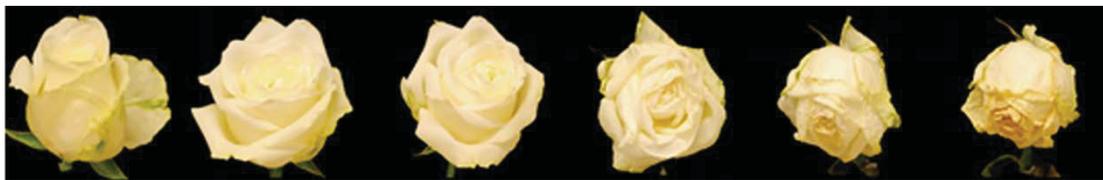


Abb. 1.2: Ethyleninduzierte Seneszenzreaktion bei *Rosa sp.* Ethylen löst u.a. Seneszenz bei Schnittblumen aus. Die Abbildung verdeutlicht diesen Prozess anhand einer Rosenblüte (Hoppen, Müller et al. 2019).

Bereits 1901 konnte Dimitri Neljubow erstmals die Wirkung von Ethylen anhand im Dunklen aufgezogener Erbsenkeimlinge zeigen. Durch Behandlung mit dem Pflanzenhormon weisen diese die sogenannte Dreifachantwort - bestehend aus einem gekrümmten Apikalhaken, einem verdickten Hypokotyl, sowie einer inhibierten Elongation von Hypokotyl und Wurzeln - auf (Neljubow 1901, Knight und Crocker 1913, Guzmán und Ecker 1990). Darüber hinaus ist Ethylen an der Vermittlung von biotischen und abiotischen Stressfaktoren beteiligt. Es wurde z. B. gezeigt, dass mechanische Verletzungen oder Pathogenbefall die Ethylenproduktion begünstigen (Williamson 1950). Dabei sind die meisten Gewebe- bzw.

Zelltypen in der Lage dieses endogene Ethylen zu synthetisieren. Von großem Vorteil ist in diesem Zusammenhang der gasförmige Charakter des Pflanzenhormons. Es kann so nicht nur innerhalb einer Zelle eine Stressantwort vermittelt werden, sondern auch schnell in entlegeneren Pflanzenteilen oder sogar umliegenden Pflanzen (Yang und Hoffman 1984, Abeles, Morgan et al. 1992).

1.3 Der Ethylensignalweg und seine Komponenten

1.3.1 Die Signalwahrnehmung

Die Signalwahrnehmung von Ethylen erfolgt über eine kleine Rezeptorfamilie, die in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist. Diese wird auf Grundlage phylogenetischer Analysen und struktureller Ähnlichkeiten in zwei Unterfamilien eingeteilt (Bleecker 1999). In *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) zählen die Rezeptoren *ethylene resistant 1* (ETR1) und *ethylene response sensor 1* (ERS1) zur ersten Unterfamilie, während die Zweite aus *ethylene resistant 2* (ETR2), *ethylene response sensor 2* (ERS2) und *ethylene insensitive 4* (EIN4) besteht. Die Rezeptoren sind in der Lage homo- oder heteromere Komplexe zu bilden, wobei die kleinste funktionelle Einheit ein Dimer ist. Diese werden kovalent über zwei N-terminale Disulfidbrücken verknüpft (Schaller, Ladd et al. 1995, Gao, Wen et al. 2008). Darüber hinaus wirken sie als Negativregulatoren. Das bedeutet, in Abwesenheit von Ethylen wird aktiv eine Reaktion auf das Pflanzenhormon unterdrückt (Hua und Meyerowitz 1998). Für die Aktivität der Rezeptoren ist ein Kupfer(I)-Kofaktor von besonderer Bedeutung. Er muss in den Transmembranbereich integriert werden, bevor die Bindung von Ethylen möglich wird. Es konnte gezeigt werden, dass die Rezeptoren anstelle von Kupfer ebenfalls in der Lage sind Silberionen zu binden. Allerdings bleibt dann eine Signaltransduktion aus (Beyer 1976, Schaller und Bleecker 1995, Rodríguez, Esch et al. 1999).

Der Ethylenrezeptor ETR1 ist hinsichtlich Aufbau, Struktur und Funktionalität am weitesten erforscht. Er setzt sich aus vier Domänen zusammen. Die Transmembrandomäne besteht aus drei membrangängigen Helices und

verankert den Rezeptor in der ER-Membran (Hall, Shakeel et al. 2007). Darüber hinaus beinhaltet sie die Bindungsstelle für den Kupfer(I)-Kofaktor, die in direktem Zusammenhang mit der Ethylenbindung steht. Es konnte gezeigt werden, dass durch den Austausch der Aminosäuren C65 und H69 der Rezeptor nicht mehr auf Ethylen reagiert (Rodríguez, Esch et al. 1999). Somit ist die Transmembrandomäne nicht nur essenziell um ein Ethylensignal wahrzunehmen, sondern auch um eine Signalweiterleitung zu induzieren. Die Cysteine an den Aminosäurepositionen 4 und 6 eines ETR1-Monomers können mit denen eines zweiten Monomers Disulfidbrücken ausbilden und sind somit maßgeblich an der Dimerisierung des Rezeptors beteiligt (Schaller und Bleecker 1995, Schaller, Ladd et al. 1995). Ebenfalls in die Dimerisierung involviert ist die GAF-Domäne (Grefen, Städele et al. 2008, Berleth, Berleth et al. 2019). Diese ist über eine zusätzliche α -Helix N-terminal mit der Transmembrandomäne verknüpft. Es konnte gezeigt werden, dass die Dimerisierungsfläche innerhalb der GAF-Domäne aus deren N- und C-terminalen Helices besteht (Milić, Dick et al. 2018). C-terminal schließt sich eine Histidinkinase-Domäne an, deren Autokinaseaktivität im Verlauf der Ethylensignaltransduktion eine wichtige Rolle spielt (Gamble, Coonfield et al. 1998, Moussatche und Klee 2004, Voet-van-Vormizeele und Groth 2008). Auf die Kinasedomäne folgt eine Antwortregulatordomäne, die eine Phosphorylgruppe auf einen konservierten Aspartatrest übertragen kann. Zusammen mit der Kinasedomäne verleiht sie ETR1 den Charakter eines bakteriellen Zwei-Komponenten-Systems (Chang, Kwok et al. 1993, Müller-Dieckmann, Grantz et al. 1999).

Anders als die Rezeptoren der ersten Unterfamilie besitzen ETR2, ERS2 und EIN4 eine zusätzliche vierte N-terminale α -Helix. Von dieser wird angenommen, dass sie als Signalsequenz fungieren könnte (Chen, Shakeel et al. 2007). Darüber hinaus besitzen die Rezeptoren der zweiten Unterfamilie eine degenerierte Kinasedomäne, die eine Serin-/Threonin-Kinaseaktivität besitzt (Sakai, Hua et al. 1998, Moussatche und Klee 2004). Darüber hinaus besitzen die Rezeptoren ERS1 und ERS2 keine Antwortregulatordomäne (Hua, Chang et al. 1995, Hua, Sakai et al. 1998). Abbildung 1.3 zeigt eine schematische Übersicht des Ethylenrezeptors ETR1 im Vergleich zu ETR2.

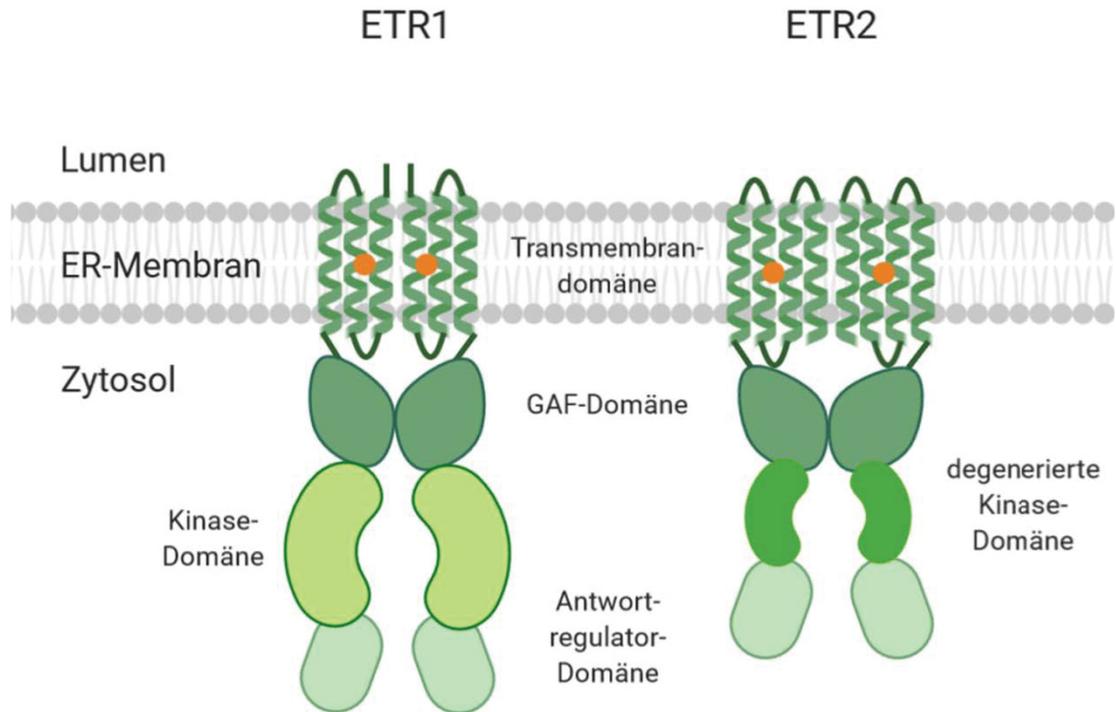


Abb. 1.3: Schematische Übersicht über die Ethylenrezeptoren ETR1 und ETR2. Beide Rezeptoren zeigen einen ähnlichen modularen Aufbau. Allgemein besitzen beide Rezeptoren eine Transmembrandomäne, eine GAF-Domäne, eine Kinase-Domäne und eine Antwortregulator-Domäne. Im Gegensatz zu ETR1 und der gesamten Unterfamilie 1, die drei Transmembranhelices besitzen, haben ETR2 und die weiteren Mitglieder der zweiten Unterfamilie eine zusätzliche, vierte N-terminale α -Helix. Darüber hinaus besitzt ETR1 eine vollständige Histidinkinasedomäne, während diese bei ETR2 degeneriert und in Form einer Serin-/Threonin-Kinase vorliegt (Abbildung erstellt mit BioRender).

In allen pflanzlichen Spezies sind diese modular immer ähnlich aufgebauten Rezeptoren in die Wahrnehmung von Ethylen involviert. Dennoch ist ihre Aufgabe nicht vollkommen redundant, sodass bei bestimmten Faktoren, z. B. Salzstress in *Nicotiana tabacum* oder Entwicklung in *Oryza sativa* eine bestimmte Isoform ein spezielles Merkmal kontrolliert (Wilson, Kim et al. 2014).

1.3.1.1 Kupfer – zwischen Notwendigkeit und Toxizität

Kupfer ist für viele physiologische Prozesse in Pflanzen von großer Bedeutung. Dazu zählen Vorgänge wie der photosynthetische Elektronentransport oder die Signalweiterleitung von Ethylen (Raven, Evans et al. 1999, Rodríguez, Esch et al. 1999).

Bereits in den 1930er Jahren wurde die Notwendigkeit des Übergangsmetalls für höhere Pflanzen bzgl. ihres vegetativen Wachstums und ihrer Reproduktion gezeigt (Lipman und Mackinney 1931, Sommer 1931). Beispielsweise weisen Tomatenpflanzen, die auf einem Nährmedium ohne Kupfer heranwachsen, einen unterentwickelten Spross, eine übermäßig schlechte Wurzelentwicklung, dunkel blau-grünes Laub, gekräuseltes Blattwerk und keine Blütenentwicklung auf. Ein für die Pflanze kritisches Kupferdefizit kann unterhalb eines Kupfergehalts von 1-5 mg/kg Pflanzentrockenmasse eintreten (Ducic und Polle 2005). Andere Metallionen sind nicht dazu in der Lage diesen Kupfermangel auszugleichen. Allerdings kann er durch Zugabe von Kupfer in das Nährmedium wieder kompensiert werden (Arnon und Stout 1939).

Dennoch hat Kupfer in zu hohen Konzentrationen auch toxische Effekte auf Pflanzen. Diese äußern sich bereits bei geringen Änderungen oberhalb der optimalen Kupferkonzentration (Fernandes und Henriques 1991) in Form von Symptomen, wie z. B. Chlorose und Nekrose. Das kann ab einer Kupferkonzentration von 20-30 mg/kg Pflanzentrockenmasse zu beobachten sein (Ducic und Polle 2005).

Generell kommt Kupfer in den Oxidationsstufen Cu^+ oder Cu^{2+} vor und wird von Pflanzen über die Wurzeln aufgenommen (Bell, Chaney et al. 1991). Der genaue Mechanismus der Kupferaufnahme ist noch nicht vollständig verstanden. Es wird jedoch von einer reduktiven Kupferaufnahme ausgegangen, bei der Kupfer(II)-Ionen an der Wurzeloberfläche in der Zellmembran zu Kupfer(I) reduziert werden (Printz, Lutts et al. 2016). Freies, monovalentes Kupfer jedoch katalysiert die Entstehung von freien Radikalen, was in der Zelle zu oxidativem Stress führt (Halliwell und Gutteridge 1984, Weckx und Clijsters 1996). Daher haben Pflanzen eine Strategie entwickelt sich davor zu schützen.

1.3.1.2 Die Kupferlieferanten der Ethylenrezeptoren

Um die schädlichen Eigenschaften monovalenten Kupfers zu umgehen, haben Pflanzen Mechanismen entwickelt Kupfer mit Hilfe von z. B. Chaperonen zur benötigten Position in der Zelle zu transportieren. Dadurch werden die Kupferionen in einer nicht-reaktiven Form gebunden, sobald sie von der Zelle aufgenommen wurden. Diese Interaktion ermöglicht es, Kupfer in der Pflanze zu z. B. Proteinen, die Kupfer als Kofaktor benötigen zu eskortieren (Valentine und Gralla 1997, Himmelblau und Amasino 2000).

Im Zusammenhang des Ethylensignalwegs kommen die löslichen Chaperone *antioxidant-1* (ATX1) und *copper transport protein* (CCH) in Frage. Diese konnten über *yeast two-hybrid*-Studien identifiziert werden (Puig, Mira et al. 2007). CCH ist ein pflanzenspezifisches Kupferchaperon und besitzt genau wie das zur gleichen Familie gehörende ATX1 ein charakteristisches Kupferbindemotiv MxCxxC. Struktur und Aufbau der Chaperone sind sehr ähnlich, abgesehen vom für CCH-spezifischen C-Terminus (Puig, Mira et al. 2007).

Neben diesen löslichen Proteinen ist die P-Typ ATPase *responsive-to-Antagonist 1* (RAN1) auf Grundlage von Mutationsstudien ebenfalls als Kupferlieferant denkbar (Hirayama, Kieber et al. 1999, Woeste und Kieber 2000). Es besitzt genau wie ATX1 und CCH auch Kupferbindemotive. Es konnte gezeigt werden, dass RAN1 nicht nur eine wichtige Rolle in der Biogenese der Ethylenrezeptoren spielt, sondern auch für die Kupferhomöostase von großer Bedeutung ist. Verliert RAN1 seine Funktion, so resultiert dies in einem generell aktiven Ethylenrezeptor, was die Signalweiterleitung des Hormons verhindert (Woeste und Kieber 2000, Binder, Rodríguez et al. 2010).

Neueste Studien belegen, dass alle drei Kupferproteine mit hoher Affinität an Ethylenrezeptoren binden können (Hoppen, Müller et al. 2019). Dadurch ergeben sich zwei mögliche zytoplasmatische Transportrouten. Die ebenfalls in der ER-Membran verankerte ATPase RAN1 kann die Ethylenrezeptoren mit Kupfer beliefern, wenn sie vorab von einem der löslichen, im Zytosol befindlichen Chaperone ATX1 oder CCH beladen wurde. Allerdings können die Chaperone auch mit den Ethylenrezeptoren direkt interagieren, was sie

ebenfalls zu Kupferlieferanten der Ethylenrezeptoren qualifiziert. Abbildung 1.4 zeigt eine Übersicht über die möglichen Transportwege des Kupfer(I)-Kofaktors zum Rezeptor.

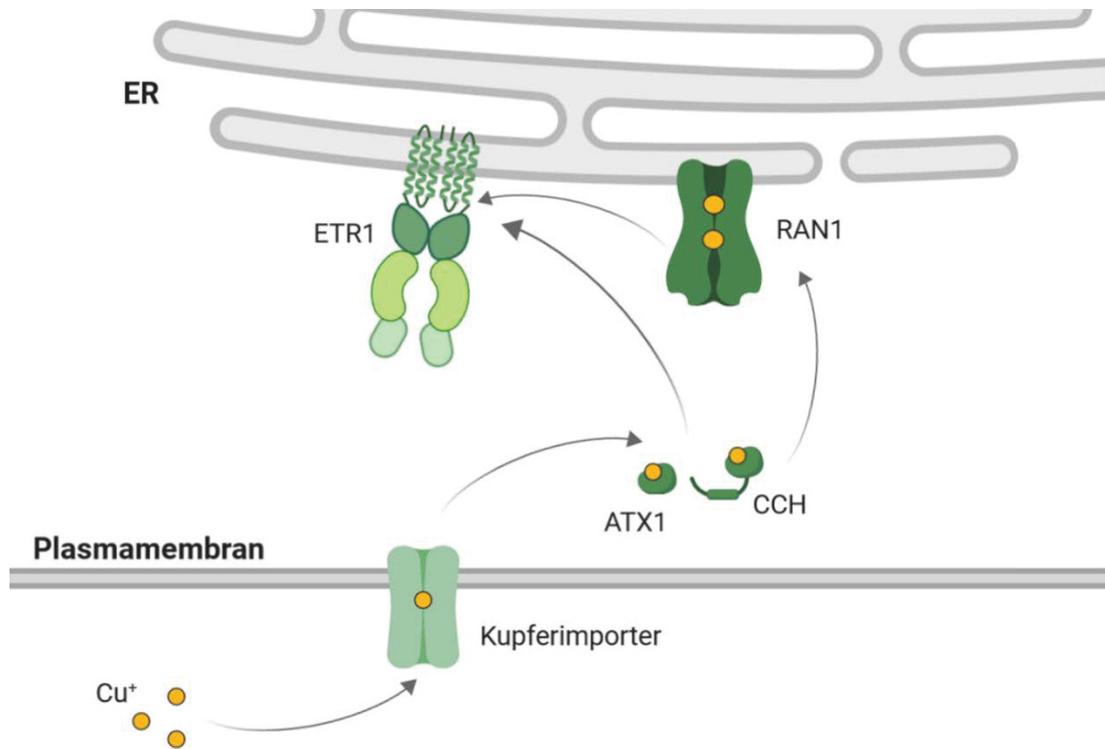


Abb. 1.4: Mögliche Transportwege des Kupfer(I)-Kofaktors zum Ethylenrezeptor. Die Abbildung fasst die möglichen Transportwege des Kupfer(I)-Kofaktors zum Ethylenrezeptor zusammen. Es kommen alle drei vorgestellten Kupferproteine dafür in Frage, nachdem ein Kupferimporter Kupfer(I)-Ionen in die Zelle geschleust hat. Die Kupferchaperone ATX1 und CCH sind nicht nur in der Lage RAN1 mit Kupfer(I)-Ionen zu beliefern, sondern können auch direkt mit dem Ethylenrezeptor interagieren (Abbildung erstellt mit BioRender).

1.3.2 Die Signaltransduktion

Da die Ethylenrezeptoren als Negativregulatoren agieren, sind sie in Abwesenheit von Ethylen aktiv. Das bedeutet, sie zeigen eine Autokinaseaktivität. Durch diese wird bei ETR1 ein konservierter Histidinrest innerhalb der Kinasedomäne phosphoryliert und diese Phosphorylgruppe auf einen konservierten, in der Antwortregulatordomäne befindlichen Aspartatrest übertragen (Voet-van-Vormizeele und Groth 2008). Die Serin-/Threonin-Kinase *constitutive triple response 1* (CTR1), die ebenfalls als Negativregulator in der Ethylensignalkette wirkt, wird aufgrund dessen vom Ethylenrezeptor aktiviert. Dies befähigt CTR1 Dimere zu bilden (Kieber, Rothenberg et al. 1993, Merchante, Alonso et al. 2013). Die Aktivität von CTR1 erlaubt es den Positivregulator ethylene insensitive 2 (EIN2) zu phosphorylieren, wodurch eine Ethylenantwort unterdrückt wird (Ju, Yoon et al. 2012).

In Anwesenheit von Ethylen verliert ETR1 seine Autokinaseaktivität. Dadurch bleibt CTR1 inaktiv, weshalb EIN2 nicht phosphoryliert wird und an den Rezeptor binden kann (Bisson und Groth 2010, Bisson und Groth 2011). Durch einen bislang ungeklärten Mechanismus wird der C-terminale Teil von EIN2 abgespalten. Dieser beinhaltet eine NLS (*nuclear localization signal*)-Sequenz, weshalb er in den Zellkern transportiert wird. Im Zellkern angelangt werden die Transkriptionsfaktoren EIN3/EIL1 stabilisiert, wodurch die Expression von Genen aktiviert wird, die für das Auslösen einer Ethylenantwort verantwortlich sind (Ju, Yoon et al. 2012, Qiao, Shen et al. 2012, Wen, Zhang et al. 2012). Abbildung 1.5 zeigt eine Übersicht über die Abläufe innerhalb der Ethylensignalkette in Ab- und Anwesenheit des Pflanzenhormons.

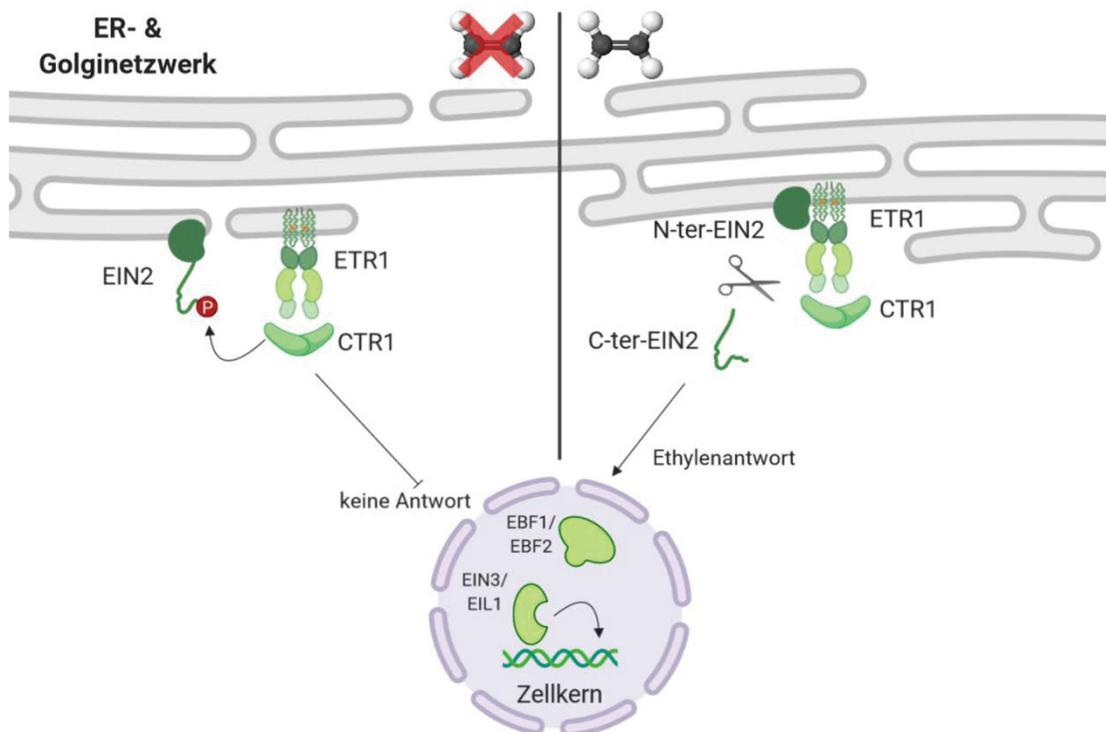


Abb. 1.5: Der Ethylensignalweg. In Abwesenheit von Ethylen sind die Negativregulatoren ETR1 und CTR1 aktiv und liegen phosphoryliert vor. Dadurch wird der Positivregulator EIN2 ebenfalls phosphoryliert und eine Ethylenantwort bleibt aus. In Anwesenheit von Ethylen liegen ETR1 und CTR1 inaktiv und nicht phosphoryliert vor, weshalb EIN2 inaktiviert und der C-terminale Teil abgespalten wird. Dieser kann aufgrund einer NLS-Sequenz in den Zellkern transportiert werden und dort die Transkriptionsfaktoren EIN3/EIL1 aktivieren. Dadurch wird eine Ethylenantwort ausgelöst.

1.4 Kupferkoordination in Proteinen

Die Kupferkoordination von Proteinen, die Kupfer als Kofaktor benötigen, wird in mehrere Kategorien unterteilt. Die Einteilung dieser sog. Kupferzentren basiert dabei auf der Anzahl der Koordinationsplätze am Protein, also der Geometrie der Kupferkoordination, und der koordinierenden Atome (Rubino und Franz 2012). Kupferzentren des Typ 1 wurden bisher am besten charakterisiert. Dabei bindet jeweils ein Kupferion und wird über die Stickstoffatome des Imidazolrings zweier Histidine und dem Schwefelatom eines Cysteins trigonal-planar koordiniert. Darüber hinaus findet eine weitere Aufteilung in unterschiedliche Klassen statt, die auf die Anzahl der zusätzlich hinzukommenden axialen Koordinationsstellen zurückzuführen ist (Holland und Tolman 1999, Rubino und Franz 2012). Beispiele für solche Proteine

sind Plastocyanin und Azurin (Colman, Freeman et al. 1978, Nar, Messerschmidt et al. 1991). In Typ 2-Kupferzentren sind hauptsächlich Histidinreste, die das Kupferion in einer quadratisch-planaren Geometrie koordinieren, in die Bindung des Metallions involviert. Es ist nicht ungewöhnlich, dass zusätzlich dazu Sauerstoffatome die Koordination unterstützen (Rubino und Franz 2012). Ein bekanntes Protein, das Kupfer auf diese Weise koordiniert, ist die Cu, Zn-Superoxid-Dismutase (Richardson, Thomas et al. 1975). Bei Typ 3-Kupferzentren werden zwei Kupferionen im Protein koordiniert. Beispielsweise besitzt das Protein Hämocyanin ein solches Kupferzentrum. Typischerweise verändert sich bei Substratbindung die Kupferkoordinationsgeometrie von trigonal-planar zu trigonal-bipyramidal (Hazes, Kalk et al. 1993, Magnus, Hazes et al. 1994, Rubino und Franz 2012).

1.5 Nachweismethoden für Kupfer

Zum Nachweis von Kupfer in einer Proteinlösung kommen verschiedene Methoden in Frage. Eine dieser Methoden ist die *inductively coupled plasma mass spectrometry* (ICP-MS). Dabei wird ein induktiv gekoppeltes Argonplasma mit einer massenspektrometrische Analyse kombiniert. Mit Hilfe dieser Methode kann eine Spurenanalyse von Schwermetallen, wie z. B. Kupfer, durchgeführt werden, da sie sich vor allem durch ein sehr niedriges Detektionslimit auszeichnet (Houk, Fassel et al. 1980, Beauchemin 1999).

Ebenfalls zur Quantifizierung von Kupferionen geeignet ist die Atomabsorptionsspektroskopie (AAS). Für das spektroskopische Verfahren ist die Atomisierung der Probe notwendig, was die Anregung der einzelnen Atome möglich macht. Aufgrund der speziellen, im Atomabsorptionsspektrometer verbauten Leuchtmittel (z. B. Hohlkathodenlampen), besitzt die Methode eine hohe Spezifität gegenüber des Analyten, da ein elementspezifisches elektromagnetisches Spektrum absorbiert werden kann (Fernández, Lobo et al. 2019).

Die Bicinchoninsäure (BCA) ist eine Dicarbonsäure, die in der Lage ist, einwertiges Kupfer zu komplexieren. Dabei werden zwei BCA-Moleküle zur Bindung eines Kupferions benötigt. Die entstehende violette Färbung des $\text{BCA}_2\text{-Cu(I)}$ -Komplexes hat ein Absorptionsmaximum bei 562 nm. Ein weiteres Maximum liegt bei 354,5 nm (Brenner und Harris 1995). In der Biochemie ist die Komplexbildung von BCA mit Kupferionen hauptsächlich zur quantitativen, photometrischen Bestimmung von Protein bekannt (Smith, Krohn et al. 1985). In dieser Arbeit wird die colormetrische Methode in abgewandelter Form für zwei unterschiedliche Fragestellungen *in vitro* verwendet. Zum einen soll damit die Bindung an ETR1 gezeigt und eine Bindungsaffinität ermittelt werden, wozu die Dissoziation, also die Entfärbung des $\text{BCA}_2\text{-Cu(I)}$ -Komplexes herangezogen wird. Zum anderen soll es dazu beitragen die Kupferstöchiometrie von ETR1 zu klären, indem nicht wie herkömmlich die Proteinkonzentration bestimmt wird, sondern die Kupferkonzentration (Drees und Lübben 2016). Abbildung 1.6 zeigt die Strukturformel von BCA sowie des violetten $\text{BCA}_2\text{-Cu(I)}$ -Komplexes.

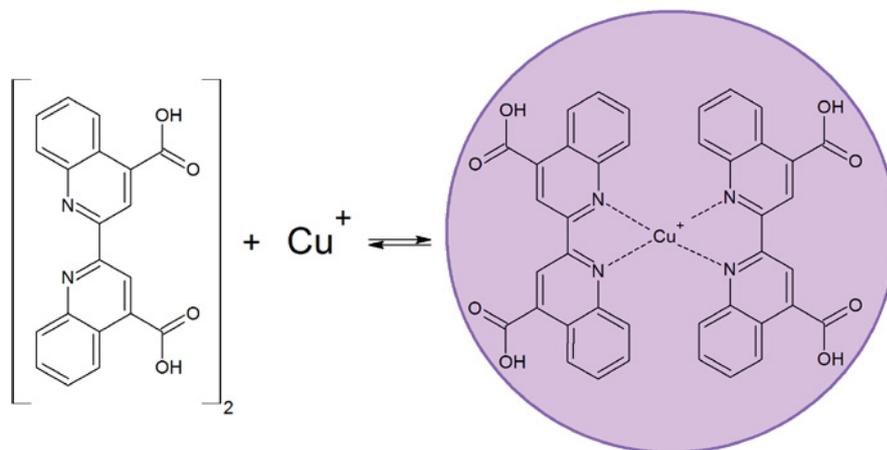


Abb. 1.6: Der $\text{BCA}_2\text{-Cu(I)}$ -Komplex. Die Abbildung zeigt anhand einer Reaktionsgleichung und Strukturformeln wie Kupfer(I)-Ionen mit BCA einen Komplex eingehen. Es werden zwei BCA-Moleküle benötigt, um ein Kupfer(I)-Ion zu koordinieren, sodass der Komplex in seiner typischen, violetten Färbung entsteht.

1.6 Zielsetzung

Der Ethylensignalweg und der in dieser Arbeit ausführlich betrachtete Ethylenrezeptor ETR1 sind nicht nur wissenschaftlich von großem Interesse. Aufgrund des Einflusses des Pflanzenhormons auf Fruchtreifung und Seneszenz kann die genaue Aufklärung von Wechselwirkungen und Prozessen während der Signalweiterleitung auch agrarökonomisch ein großes Potential bieten.

In dieser Arbeit steht die Transmembrandomäne des Ethylenrezeptors ETR1 im Focus. Dabei sollte vor allem die Bindung des Kupfer-Kofaktors untersucht werden. Dazu zählt neben der erfolgreichen Expression und Isolation auch die Überprüfung der hier verwendeten Rezeptorvarianten hinsichtlich Faltung und Funktionalität. Darüber hinaus sollte die Kupferbindung der Rezeptordomäne mittels photometrischer Analysen, Elektronenspinresonanz und Röntgenabsorptionsspektroskopie genauer untersucht und die Bindungsaffinität des Kupfer-Kofaktors und die Kupfer-Proteinstöchiometrie bestimmt werden. Letztendlich sollte der Kupfertransfer von Kupferchaperonen auf die Transmembrandomäne von ETR1 gezeigt werden. Derzeit liegen keine experimentellen Strukturdaten der Transmembrandomäne vor. Jedoch konnte von Stephan Schott-Verdugo und Prof. Holger Gohlke aus dem Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mittels *ab initio* Strukturvorhersagen und koevolutionären Informationen ein Strukturmodell vorgeschlagen werden. Mit Hilfe von Tryptophan-*Scanning*-Mutagenese sollte dieses Modell experimentell validiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien wurden –wenn nicht anders vermerkt- bei den Firmen AppliChem (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Fisher Scientific (Schwerte), Glycon Biochemicals GmbH (Luckenwalde), Grüssing (Filsum), Merck (Darmstadt), New England Biolabs (Frankfurt a.M.), Sigma-Aldrich (Mannheim), Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA), Th. Geyer (Renningen) und VWR (Darmstadt) bezogen.

Lösungen und Nährmedien wurden ausschließlich mit demineralisiertem und entkeimtem Wasser aus einer Milli-Q-Filteranlage (im Folgenden als ddH₂O bezeichnet) hergestellt.

2.1.2 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
Brutschrank	Memmert, Schwalbach
BioDoc Analyze	Biometra, Jena
Cell Disruption System	Constant Systems, Daventry (England)
DU 800 Spectrophotometer	Beckmann Coulter, Krefeld
Eppendorf Kühlzentrifuge 5810R und 5430R	Eppendorf, Hamburg
Infinite M200 PRO	Tecan, Männedorf (Schweiz)
Innova 44R Inkubationsschüttler	New Brunswick / Eppendorf AG, Hamburg
Jasco-715 Spectropolarimeter	Jasco GmbH, Gross-Umstadt

Luftpolsterpipetten	Gilson, Bad Camberg
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
Nano Quant Platte	Tecan, Männedorf (Schweiz)
Optima™ L-80 XP Ultrazentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld
PEQLAB Power Supply EV265	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
PerfectBlue DNA-Gelkammersystem	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
PerfectBlue Elektrophoresesystem	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
PerfectBlue Semi-Dry Elektrobloetter	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Polymax 1040 Taumelschüttler	Heidolph, Schwalbach
Rotoren: JLA 8.1, JA-25.50, Ti70.1, SW-32 Ti	Beckman Coulter, Krefeld
Thermomixer compact/comfort	Eppendorf, Hamburg
T Professional Thermocycler	Biometra, Göttingen
Zylindrische Quarzküvette	Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim

2.1.3 Chromatographie- und Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Amicon Ultrafiltratoren (3 kDa und 30 kDa MWCO)	Millipore, Schwalbach
Einwegspritzen	Braun, Melsungen
Halbmikroküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
HiPrep™ 16/60 Sephacryl® S-200 HR [120 mL, 16 x 600 mm]	GE Healthcare, München
HisTrap FF Säulen [5 mL, 16 x 25 mm]	GE Healthcare, München
Mikrotiterplatten (transparent, 96er)	Sarstedt, Nümbrecht

PD-10 Sephadex™ G-25 Säulen	GE Healthcare, München
PD MiniTrap G-25	GE Healthcare, München
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
PVDF-Membran (0,45 µm und 0,2 µm Porengröße)	GE Healthcare, München
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Quartz SUPRASIL Macro/Semi- micro Küvetten	PerkinElmer, Massachusetts (USA)
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen mit Schraubverschluss (15 mL/50 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen mit Schraubverschluss (12 mL, Rundboden)	Greiner, Kremsmünster (Österreich)
Superdex 200 Increase 10/300 GL [24 mL, 10 x 300 mm]	GE Healthcare, München
Spritzenvorsatzfilter	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.4 Antikörper

Primärantikörper

Anti-His-HRP Antikörper (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach):

Der monoklonale Antikörper erkennt einen N- oder C-terminalen Histidin-Tag ab einer Kettenlänge von 6 Histidinen und wurde in einer 1:10.000 Verdünnung verwendet. Da er direkt an die Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt ist, ist die Verwendung eines Sekundärantikörpers nicht notwendig.

C-terminaler Anti-His-HRP Antikörper (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach):

Der monoklonale Antikörper erkennt einen C-terminalen Histidin-Tag ab einer Kettenlänge von 6 Histidinen mit höherer Sensitivität als der Anti-His-HRP Antikörper und wurde in einer 1:10.000 Verdünnung eingesetzt. Da er direkt an die HRP gekoppelt ist, ist die Verwendung eines Sekundärantikörpers nicht nötig.

2.1.5 Konstrukte und Bakterienstämme

Die DNA-Sequenzen zur Herstellung der verwendeten, rekombinanten Ethylenrezeptoren und deren benötigte Mutanten lagen in den Vektoren pET16b oder pET15b vor und wurden davon ausgehend konstruiert. Alle Vektoren verfügen über ein Ampicillinresistenzgen und stehen unter Kontrolle des *lacI*-Promotors, sodass die Proteinexpression durch Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induzierbar ist. pET16b enthält einen N-terminalen 10xHistidin-Tag mit darauffolgender *Factor Xa* Schnittstelle, wohingegen pET15b einen 6xHistidin-Tag mit anschließender Thrombin-Schnittstelle besitzt. Die Vektoren wurden wenn nötig, den Anforderungen entsprechend, modifiziert. So wurde z. B. ein pET15b-Konstrukt mit einem 6xHistidin-Tag am C-Terminus des benötigten Proteins erstellt. Gleichzeitig wurde eine Thrombin-Schnittstelle zwischen der DNA-Sequenz des Proteins und dem Histidin-Tag integriert. Eine Liste mit allen verwendeten Plasmid-Konstrukten und deren Vektorkarten sind dem Anhang (Kapitel 7.3) zu entnehmen.

Der Bakterienstamm *E. coli* XL1 *blue* wurde zur Vermehrung von Plasmid-DNA verwendet (Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacIqZ Δ M15Tn10(Tetr)]*). Die Zellen wurden von der Firma Stratagene bezogen.

Zur heterologen Expression der in dieser Arbeit verwendeten membranständigen Proteine wurde der dafür besonders geeignete *E. coli*-Stamm C43 (DE3) (Arechaga, Miroux et al. 2000) verwendet (Genotyp: *F – ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm* (DE3)). Die Zellen wurden von der Firma Lucigen Corporation bezogen.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 *Round the horn site-directed* Mutagenese

Für bereits bestehende Plasmidkonstrukte, in die eine Punktmutation eingefügt oder die verkürzt werden sollten, wurde die Strategie der *Round the horn site-directed* Mutagenese angewendet. Diesem Prinzip liegt die Polymerasekettenreaktion (PCR) zugrunde. Dabei wird das

2 Material und Methoden

Oligonukleotidenpaar so gewählt, dass sie an ihrem 5'-Ende phosphoryliert vorliegen und die zu verändernden Basen bereits tragen. Wird das erste Oligonukleotid auf einem DNA-Strang positioniert, muss das reverse Oligonukleotid direkt daran angrenzend auf dem komplementären Strang liegen (Follo und Isidoro 2008). Eine typische PCR für diese Mutagenesestrategie setzt sich wie in Tabelle 1 gezeigt zusammen.

Tab. 1: Zusammensetzung eines typischen PCR-Ansatzes.

Komponente	Konzentration	Verwendetes Volumen [μL]
Template-DNA	10 ng	1
5'-Oligonukleotid	10 μM	2,5
3'-Oligonukleotid	10 μM	2,5
dNTPs	10 μM	1
5x GC- oder 5x HF-Puffer	1x	10
Phusion HF DNA Polymerase	2 U/ μL	0,5
ddH₂O	-	32,5

Der zeitliche Ablauf der oben aufgeführten PCR ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tab. 2: Zeitlicher Ablauf einer typischen PCR-Reaktion. x gibt die Annealing-Temperatur des entsprechenden Oligonukleotidenpaars an. y steht für die Elongationszeit, für die 30 sec/kb kalkuliert wurden.

Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Länge [sec]	Anzahl der Zyklen
98	30	1
98	10	
x	30	35
72	Y	
72	600	1
4	∞	

Nach Ablauf der PCR wurde die amplifizierte DNA mit dem Enzym DpnI für 1 h bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert, um methylierte Template-DNA abzubauen. Anschließend wurde DpnI für 20 min bei 80 $^{\circ}\text{C}$ hitzeinaktiviert.

Der Ligationsansatz des mutagenisierten, linearen DNA-Doppelstrangs bestand aus den in Tabelle 3 aufgeführten Komponenten und wurde für mindestens 10 min bei RT inkubiert.

Tab. 3: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes.

Komponente	Verwendetes Volumen [μL]
PCR-Produkt	8
<i>5x rapid ligation</i>	4
Puffer	
T4 Ligase	1
ddH ₂ O	7

5x rapid ligation Puffer:

- 330 mM TRIS/HCl pH 7,6
- 50 mM MgCl₂
- 5 mM DTT
- 5 mM ATP
- 3,75 % (w/v) PEG

Das fertige, zirkuläre Plasmid wurde für weitere Verfahren, wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben, in *E. coli* XL1 *blue* transformiert.

2.2.2 Verknüpfung von DNA-Fragmenten nach *Gibson*

Die Verknüpfung zweier DNA-Fragmente (z. B. Vektor und Rezeptorsequenz/Insert) erfolgte nach Gibson. Dazu wurden beide DNA-Fragmente zunächst aus der jeweiligen Template-DNA mit entsprechenden Oligonukleotiden separat amplifiziert und mit DpnI inkubiert (vgl. Kapitel 2.2.1). Die DNA wurde in einem Agarosegel aufgetrennt und daraus isoliert (vgl. Kapitel 2.2.3 und 2.2.4). Zur Verknüpfung beider DNA-Fragmente wurde ein Mastermix nach Gibson hinzugezogen. Dieser enthält die in Tabelle 4 angegebenen Bestandteile.

Tab. 4: Zusammensetzung eines typischen Ansatzes zur Verknüpfung von DNA-Fragmenten nach *Gibson*.

Komponente	Ausgangskonzentration der einzelnen Komponenten	Volumen für 1,2 mL Mastermix [μL]
IT-Puffer	5x	320
T5 Exonuklease	10 U/ μL	0,64
Phusion HF DNA Polymerase	2 U/ μL	20
Taq DNA Ligase	40 U/ μL	160
ddH ₂ O	-	699

5x IT-Puffer:

- 500 mM TRIS/HCl pH 7,5
- 50 mM MgCl₂
- 50 mM DTT
- 10 mM NAD⁺
- 1 mM dNTPs
- 25 % (w/v) PEG 8000

Zur Verknüpfung der DNA-Fragmente wurden Vektor und Insert in einem Verhältnis von 1:3 und einem Endvolumen von 2,5 μL verwendet und mit 7,5 μL des *Gibson* Mastermixes versetzt. Die Verknüpfung erfolgte zunächst für 10 min bei 50°C und anschließend für weitere 60 min bei 40°C.

Dabei baut die Exonuklease an den 5'-Enden der DNA-Fragmente einige Basen ab. Die entstehenden Überhänge am 3'-Ende sind durch die Wahl der Oligonukleotide bei Vektor und Insert komplementär, sodass sich diese aneinander anlagern können. Die enthaltene DNA-Polymerase baut den DNA-Strang wieder auf und die Ligase verbindet die Lücken zwischen den einzelnen Fragmenten zur Vervollständigung des finalen, zirkulären Plasmids (Gibson, Young et al. 2009). Das Plasmid wurde für weitere Zwecke in *E. coli XL1 blue* transformiert (vgl. Kapitel 2.3.2).

2.2.3 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten mit unterschiedlicher Kettenlänge wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Dabei wandern die negativ geladenen DNA-Fragmente im elektrischen Feld zum positiven Pol und werden anhand ihrer Größe aufgetrennt, da sich kleinere Moleküle schneller durch die Agarosematrix bewegen als größere.

Dazu wurde 1% Agarose in TAE-Puffer aufgeköcht und mit 0,5 µg/mL Ethidiumbromid versetzt. Dieses dient später zum Detektieren der DNA, da es mit dieser interkaliert. Die zu analysierenden DNA-Proben wurden mit 10xProbenpuffer versetzt und auf das Agarosegel aufgetragen. Zum Abschätzen der Fragmentgröße wurde ein Größenstandard (1 kb DNA Ladder, NEB) hinzugezogen. Die Proben wurden für 60 min bei 100 V aufgetrennt.

<u>TAE-Puffer:</u>	<u>10x Probenpuffer:</u>
<ul style="list-style-type: none">○ 40 mM TRIS/HCl pH 8,4○ 1 mM EDTA○ 0,114 % (v/v) Essigsäure	<ul style="list-style-type: none">○ 50% (v/v) Glycerin○ 0,1% (w/v) Bromphenolblau

2.2.4 DNA-Isolation aus einem Agarosegel

Die Isolation von DNA aus einem Agarosegel erfolgte mit dem *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* von GE Healthcare und wurde nach Herstellerangaben eingesetzt.

2.2.5 Vermehrung und Gewinnung von Plasmid-DNA

Die Vermehrung von Plasmid-DNA erfolgte, indem 5 mL 2YT-Medium (vgl. Kapitel 2.3.1) mit einer aus einer Transformation (vgl. Kapitel 2.3.2) gewachsenen Bakterienkolonie inokuliert wurde. Der Ansatz wurde ü.N. bei 37°C und 180 rpm inkubiert.

Die Präparation der vermehrten Plasmid-DNA erfolgte nach Herstellerangaben mit dem *Monarch® Plasmid Miniprep Kit* von NEB.

2.2.6 Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurden 2 µL Probe am *Infinite M200 Pro* Plattenlesegerät mit einer NanoQuant Platte von Tecan bei einer Absorption von 260 nm vermessen. Zusätzlich wurde die Absorption bei 280 nm bestimmt, um Auskunft über den Reinheitsgrad der Probe zu erhalten. Liegt der Quotient der Absorption von 260 nm und 280 nm zwischen 1,8 und 2, ist von reiner DNA auszugehen.

2.2.7 Sequenzierung

Die Verifizierung von mutagenisierten Plasmiden wurde von der Firma Microsynth SEQLAB (Göttingen) mittels der Sequenzierungsmethode nach Sanger durchgeführt.

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Nährmedien zur Kultivierung von *E. coli*- Zellen

2YT-Medium:

- 1,6% (w/v) Pepton
 - 1,0% (w/v) Hefe
 - 0,5% (w/v) NaCl
- (pH 7,3 durch NaOH-Zugabe)

Benötigte Nährmedien wurden im Autoklav 20 min bei 121°C sterilisiert und unmittelbar vor Verwendung mit 100 µg/mL Ampicillin zur Selektion versetzt. Für Agarplatten wurde das 2YT-Medium mit 1,5% (w/v) Agar versetzt.

2.3.2 Transformation mittels Hitzeschock

2.3.2.1 Transformation nach Ligation

Zur Transformation eines Plasmids im Anschluss an eine Ligation wurden 50 µL kompetente *E. coli* XL1 *blue*-Zellen mit 10 µL Ligationsansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 45 sec bei 42°C. Die Zellen wurden für weitere 2 min auf Eis inkubiert, bevor sie mit 300 µL 2YT-Medium versetzt und für 1h bei 37°C und 750 rpm inkubiert

wurden. 200 μL des Transformationsansatzes wurden auf einer Agarplatte ausgestrichen und ü.N. bei 37°C im Brutschank kultiviert.

2.3.2.2 Transformation isolierter Plasmide

1 μL bereits vorliegender, verifizierter Plasmide wurden mit 50 μL kompetenter *E. coli*-Zellen des gewünschten Stamms für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 90 sec bei 42°C. Danach wurden die Zellen für 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 600 μL 2YT-Medium wurden die Zellen für 1 h bei 37°C und 750 rpm inkubiert. Auf einer Agarplatte wurden 30 μL der Zelllösung ausgestrichen und ü.N. bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

2.3.3 Heterologe Expression von ETR1 und Rezeptorvarianten

Für die Expression der Ethylenrezeptorkonstrukte im *E. coli*-Stamm C43 wurden 500 mL 2YT-Medium in einem 1L Kolben (unschikaniert) mit Ampicillin versetzt und mit einer Kolonie einer Transformationsplatte inokuliert. Diese Vorkultur wurde ü.N. bei 30°C und 180 rpm kultiviert. Die jeweilige Hauptkultur (500 mL Medium in 1 L schikanierten Kolben) wurde mit Ampicillin versetzt und aus der Vorkultur auf eine $\text{OD}_{600}=0,1$ eingestellt.

2.3.3.1 Expression von ETR1_TMD und Mutanten

Der inokulierten Hauptkultur wurden 2% EtOH p.a. zugesetzt und bei 30°C und 180 rpm bis zu einer $\text{OD}_{600}=0,4$ inkubiert. Die Temperatur wurde auf 16°C reduziert und weiterhin bis zu einer $\text{OD}_{600}=0,6$ inkubiert. Die Expression wurde mit 0,5 mM IPTG induziert und für 20 h kultiviert. Durch Zentrifugation bei 7.000 xg und 4°C für 15 min wurden die Zellen geerntet und bei -80°C gelagert.

2.3.3.2 Expression von ETR1 und Mutanten

Die Hauptkultur für ETR1-Vollängenkonstrukte wurde in 2YT-Medium inokuliert und bei 30°C und 180 rpm bis zu einer $\text{OD}_{600}=0,8$ inkubiert. Die Expression wurde mit 0,5 mM IPTG induziert. Die Kultivierung erfolgte für 5 h bei 30°C, bevor die Zellen durch Zentrifugation bei 7.000 xg und 4°C für 15 min geerntet wurden. Die Zellen wurden bei -80°C gelagert.

2 Material und Methoden

Bei der Expression der Ethylenrezeptoren, deren Teilkonstrukten und Mutanten wurden zu bestimmten Zeitpunkten Proben zur Analyse mittels Westernblot (vgl. Kapitel 2.4.5) entnommen. Dazu wurde 1 mL der Kultur abgenommen, bei 14.000 rpm 1 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 150 μL ddH₂O resuspendiert, mit 50 μL 4xSDS-Probenpuffer (vgl. Kapitel 2.4.4) versetzt und bei -20°C gelagert.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe der Absorption bei 280 nm bestimmt. Dazu wurde ein *Infinite M200 Pro* Plattenlesegerät mit einer NanoQuant Platte von Tecan verwendet. Die Berechnung erfolgte durch das Lambert-Beersche-Gesetz, dessen allgemeine Gleichung wie folgt lautet:

$$A = M * \epsilon * d \quad (\text{Gl. 1})$$

$$M = \frac{A}{\epsilon * d} \quad (\text{Gl. 1a})$$

A	Absorption	
M	Konzentration	[mol/L]
ϵ	Extinktionskoeffizient	$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
d	Schichtdicke	cm

Um die Proteinkonzentration in mg/mL zu erhalten, wurde die folgende Formel angewendet:

$$c = M * MW \quad (\text{Gl. 2})$$

c	Konzentration	mg/mL
M	Konzentration	mol/L
MW	Molekulargewicht	g/mol

2.4.2 Konzentrierung der Proteinproben

Zur Erhöhung der Proteinkonzentration wurde die Methode der Ultrafiltration durchgeführt. Dazu wurde ein passender Filter entsprechend der jeweiligen Proteingröße gewählt (Millipore, Schwalbach). Durch Zentrifugation bei einer durch den Hersteller festgelegten, maximalen Geschwindigkeit wurde die Proteinlösung entweder bis zur gewünschten Konzentration oder zum gewünschten Volumen filtriert. Der Durchlauf wurde verworfen, während der Überstand für weitere Zwecke (vgl. z. B. Pufferwechsel Kapitel 2.4.3) verwendet wurde.

2.4.3 Überführen von Proteinen in eine neue Pufferlösung

Zum Entfernen von z. B. Imidazol aus der Proteinlösung nach der Isolation von Proteinen (vgl. Kapitel 2.5) oder des $\text{BCA}_2\text{-Cu(I)}$ -Komplexes nach Beladung von Proteinen mit Kupferionen (vgl. Kapitel 2.7) wurde ein Pufferwechsel mittels PD-10 oder PD MiniTrap Säulen (GE Healthcare, München) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dieser Methode liegt das Prinzip der *size exclusion*-Chromatographie (SEC) zugrunde. Dabei wandern größere Moleküle schneller durch das Säulenmaterial als kleinere, die in den Poren der Matrix verweilen. So kann die Proteinlösung in einen neuen Puffer überführt werden.

2.4.4 SDS-PAGE und Färbung aufgetrennter Proteine mit kolloidalem Coomassie

Bei einer diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine anhand ihres Molekulargewichts in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Vorab wird die zu analysierende Probe mit 4xSDS-Puffer versetzt. Durch das darin enthaltene SDS und β -Mercaptoethanol werden die Proteine reduziert, denaturiert und erhalten eine negative Oberflächenladung. Diese ist proportional zur Masse des jeweiligen Proteins. Die SDS-PAGE eignet sich somit, um den Reinheitsgrad einer Proteinlösung zu ermitteln.

Für die in dieser Arbeit verwendeten Proteine wurden je nach deren Molekulargewicht SDS-Gele mit 12%igem bzw. 18%igem Acrylamidanteil verwendet. Die genaue Zusammensetzung für drei SDS-Gele ist in Tabelle 5 aufgeführt.

Tab. 5: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Gele.

Komponente	Trenngel 12%	Trenngel 18%	Sammelgel 5%
		[mL]	
Acrylamidmix [30%]	12	18	2,7
TRIS/HCl pH 8,8 [1,5 M]	7,5	7,5	-
TRIS/HCl pH 6,8 [1 M]	-	-	2
SDS [10%]	0,3	0,3	0,16
ddH₂O	9,9	3,9	10,8
APS [10%]	0,3	0,3	0,16
TEMED	0,012	0,012	0,016

Zur Beladung des SDS-Gels wurden Probestaschen mit Hilfe eines Kamms in das Sammelgel integriert. Die Proteinlösungen eines beladenen SDS-Gels wurden bei 25 – 30 mA für ca. 1 h in SDS-Laufpuffer aufgetrennt. Zur späteren Bestimmung der Proteingröße wurde ebenfalls ein Größenstandard (*PageRuler Unstained Protein Ladder* oder *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermoscientific, Schwerte)) aufgetragen.

Anschließend wurde das Gel 3 x 10 min in warmem Wasser gewaschen und für mindestens 2 h in kolloidaler Coomassie Färbelösung inkubiert. Bevor eine Dokumentation des Gels stattfand, wurde erneut 3 x 10 min mit warmem Wasser gewaschen.

<p><u>Kolloidales Coomassie:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 5% (w/v) Al₂(SO₄)₃ ○ 2,4% (v/v) H₃PO₄ ○ 10% (v/v) EtOH ○ 0,1% (w/v) Coomassie G250 	<p><u>4xSDS-Blaupuffer:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 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
<p><u>SDS-Laufpuffer:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 25 mM TRIS ○ 192 mM Glycin ○ 0,05% (w/v) SDS 	

2.4.5 semidry Westernblot und immunologische Detektion

Bei einem Westernblot werden Proteine aus einem SDS-Gel (vgl. Kapitel 2.4.4) in einem elektrischen Feld auf eine PVDF-Membran überführt. Das dient einer späteren spezifischen immunologischen Detektion von Proteinen. Dazu wurden 3 Lagen *Whatman*-Filterpapier in Transferpuffer äquilibriert und auf die Anode der Blotapparatur gelegt. Nachdem die PVDF-Membran in Methanol aktiviert, in Transferpuffer äquilibriert und auf die Filterpapiere gelegt wurde, wurde das SDS-Gel ebenfalls darauf positioniert. Nach weiteren 3 Lagen äquilibriertem Filterpapier, die als Abschluss auf das SDS-Gel gelegt wurden, wurde der Deckel (die Kathode) der Apparatur geschlossen. Der Proteintransfer erfolgte für 60 bis 90 min bei 1 mA/cm^2 .

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran für $2 \times 15 \text{ min}$ in Blockierlösung, $2 \times 10 \text{ min}$ in TBT und $1 \times 10 \text{ min}$ in TBS gewaschen. Die Inkubation mit Primärantikörper erfolgte in entsprechender Verdünnung in Blockierlösung für 1 h bei RT oder ü.N. bei 4°C . Anschließend erfolgten erneut Waschschrte für $2 \times 10 \text{ min}$ in TBT und $1 \times 10 \text{ min}$ in TBS. Wurde ein Sekundärantikörper benötigt, wurde die Membran mit diesem für 1 h bei RT inkubiert und danach für $2 \times 10 \text{ min}$ in TBT und $1 \times 10 \text{ min}$ in TBS gewaschen.

Die immunologische Detektion erfolgte mit dem *Luminescent Image Analyzer LAS-4000 mini*, der Chemolumineszenzreaktionen detektieren kann. Durch die Zugabe der Entwicklerlösung (*Westernblotting Luminol Reagent*, Santa Cruz Biotechnology) auf die Membran wird das enthaltene Luminol in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid von der an den Antikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase (HRP) oxidiert. Das emittierte, detektierte Licht repräsentiert also solche Proteine, an die der Antikörper gebunden wurde.

<u>Transferpuffer:</u> <ul style="list-style-type: none">○ 25 mM TRIS/HCl pH 8,4○ 150 mM Glycin○ 10 % (v/v) EtOH	<u>TBS:</u> <ul style="list-style-type: none">○ 10 mM TRIS/HCl pH 7,5 - 8○ 150 mM NaCl
<u>Blockierlösung:</u> <ul style="list-style-type: none">○ 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS	<u>TBT:</u> <ul style="list-style-type: none">○ 20 mM TRIS/HCl pH 7,5 - 8○ 500 mM NaCl○ 0,05 % (v/v) Tween

2.5 Proteinreinigung

2.5.1 Zellaufschluss und Membranpräparation

Für den Zellaufschluss wurden die Bakterienzellen, die das gewünschte Protein enthalten, in Puffer Z resuspendiert (5 mL/g Zellen) und eine Spatelspitze DNaseI hinzugefügt. Die Zellen wurden am *Cell Disruption System* bei 4°C mit einem Druck von 2,4 kbar aufgebrochen. Das Zelllysate wurde bei 14.000 xg für 30 min bei 4°C und der Überstand erneut bei 40.000 xg für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Das daraus resultierende Pellet wurde in Puffer Z resuspendiert, auf Rundbodenröhrchen verteilt und ein weiteres Mal bei 34.000 xg für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

<u>Puffer Z:</u> <ul style="list-style-type: none">○ 140 mM NaCl○ 2,7 mM KCl○ 10 mM Na₂HPO₄○ 1,8 mM KH₂PO₄○ 10% (w/v) Glycerin○ 0,002 % (w/v) PMSF

2.5.2 Solubilisierung und Isolation der Sensordomäne von ETR1 und Mutanten

Zur Solubilisierung von ETR1_TMD und dessen hier verwendeten Mutanten wurde das Detergenz FosCholin-16 eingesetzt. Ein Membranpellet (vgl. Kapitel 2.5.1) wurde in 10 mL Puffer S resuspendiert und bei RT auf einem Magnetrührer bei 700 rpm gerührt. Nach 1 h wurde die Proteinlösung bei

2 Material und Methoden

229.000 xg und 4°C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde für eine immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie (IMAC) verwendet. Dazu wurde er mit 1 mL/min auf eine in Puffer A äquilibrierte HisTrap FF-Säule geladen, die an eine ÄKTAprime plus bei 4°C angeschlossen war. Es folgte ein Waschritt mit 20 Säulenvolumen (SV) Puffer ATP, um das möglicherweise gebundene Hitzeschockprotein DnaK zu entfernen (Rial und Ceccarelli 2002). Unspezifisch an die Säule gebundenes Protein wurde durch einen Waschschritt mit 50 mM Imidazol (20% Puffer B) entfernt. ETR1_TMD und dessen Varianten wurden mit 250 mM Imidazol (100% Puffer B) von der Säule eluiert. Die Proteinkonzentration wurde erhöht, bis ein Volumen von 2,5 mL erreicht wurde (vgl. Kapitel 2.4.2). Anschließend wurde ein Pufferwechsel in einen gewünschten neuen Puffer (i.d.R. Puffer A) vorgenommen (vgl. Kapitel 2.4.3). Danach wurde die Proteinkonzentration erneut bis zur benötigten Konzentration erhöht (vgl. Kapitel 2.4.2) und für 30 min bei 4°C und 229.000 xg zentrifugiert. Wurde das Protein im Anschluss nicht direkt für weitere Versuche verwendet, wurde es mit einer Endkonzentration von 20% Glycerin in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Zur Überprüfung der Reinheit wurden von allen Reinigungsschritten Proben entnommen und mittels SDS-PAGE (vgl. Kapitel 2.4.4) und Westernblot (vgl. Kapitel 2.4.5) analysiert.

Wurde das Proteinkonstrukt mit C-terminalem 6x-Histidin-Tag verwendet, konnte über die enthaltene Thrombinschnittstelle der Histidin-Tag ü.N. bei 4°C mit 10 Units Thrombin (GE Healthcare, München) pro mg Protein abgetrennt werden.

<u>Puffer S:</u> <ul style="list-style-type: none"> ○ 50 mM TRIS/HCl pH 8 ○ 200 mM NaCl ○ 1,2 % (w/v) FosCholin-16 ○ 0,002% (w/v) PMSF 	<u>Puffer A:</u> <ul style="list-style-type: none"> ○ 50 mM TRIS/HCl pH 8 ○ 200 mM NaCl ○ 0,015% FosCholin-16 ○ 0,002% (w/v) PMSF
<u>Puffer ATP:</u> <ul style="list-style-type: none"> ○ 50 mM TRIS/HCl pH 8 ○ 200 mM NaCl ○ 50 mM KCl ○ 20 mM MgCl₂ ○ 10 mM ATP ○ 0,015% FosCholin-16 ○ 0,002% (w/v) PMSF 	<u>Puffer B:</u> <ul style="list-style-type: none"> ○ 250 mM Imidazol in Puffer A

2.5.3 Größenausschlusschromatographie (SEC)

Für ETR1_TMD und dessen hier verwendete Varianten war es nötig, einen zusätzlichen Reinigungsschritt in Form einer SEC durchzuführen. Dadurch wurden Proteinaggregate abgetrennt und die Homogenität des Proteins sichergestellt. Zu diesem Zweck wurde eine mit entgastem und filtriertem Puffer A äquilibrierte Superdex 200 Increase 10/300 GL-Säule verwendet. Die SEC wurde an einer ÄKTAprime plus bei 4°C durchgeführt. Die entsprechenden Proteinfractionen wurden gesammelt und die Proteinkonzentration erhöht (vgl. Kapitel 2.4.2). Zur Analyse mittels SDS-PAGE (vgl. Kapitel 2.4.4) und Westernblot (vgl. Kapitel 2.4.5) wurden Proben entnommen.

2.5.4 Denaturierende Isolation und Renaturierung von ETR1 und Rezeptorvarianten

Für die denaturierende Reinigung von ETR1-Volllängenproteinen wurde Harnstoff eingesetzt. Je zu reinigendem Membranpellet (vgl. Kapitel 2.5.1) wurden 10 mL Puffer D zur Resuspendierung verwendet. Die Solubilisierung erfolgte für 2 h bei 37°C unter Rühren bei 700 rpm. Darauf folgte ein Zentrifugationsschritt bei 100.000 xg und RT für 30 min. Der Überstand wurde auf eine in Puffer D äquilibrierte HisTrap FF Säule, die an eine ÄKTAprime plus bei RT angeschlossen war, geladen. Die Säule wurde mit 50 mM Imidazol (10% Puffer E) gewaschen und das Protein mit 500 mM Imidazol (100% Puffer E) eluiert. Die Proteinkonzentration wurde bis auf ein

2 Material und Methoden

Volumen von 1,5 mL erhöht, auf 15 mL Puffer D aufgefüllt und die Probe erneut bis zu einer finalen Konzentration von 0,8 mg/mL konzentriert. Das gereinigte Protein wurde in 500 μ L Aliquots bei RT gelagert.

Zur Renaturierung von ETR1-Vollängenproteinen wurde je 500 μ L Aliquot 100 mM DTT zugesetzt und mit 10 mL Puffer R schwungvoll gemischt. Die Lösung wurde für 30 min bei 229.000 xg und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration bis zu einem Volumen von 500 μ L erhöht und der Puffer zu Puffer C₁ gewechselt (vgl. Kapitel 2.4.2 und 2.4.3). Die Proteinkonzentration wurde danach erneut bis zu einer finalen Konzentration von 0,1-0,3 mg/mL erhöht (Schott-Verdugo, Müller et al. 2019). Das Protein wurde danach für Circular dichroismus-Messungen (vgl. Kapitel 2.6) verwendet. Die Reinheit wurde mittels SDS-PAGE (vgl. Kapitel 2.4.4) und Westernblot (vgl. Kapitel 2.4.5) überprüft.

<u>Puffer D:</u> <ul style="list-style-type: none">○ 50 mM TRIS/HCl pH 8○ 100 mM NaCl○ 8 M Harnstoff	<u>Puffer E:</u> <ul style="list-style-type: none">○ 500 mM Imidazol in Puffer D
<u>Puffer R:</u> <ul style="list-style-type: none">○ 55 mM TRIS/HCl pH 8○ 264 mM NaCl○ 55 mM KCl○ 0,1% (w/v) DDM○ 1,1 mM EDTA○ 10 mM DTT○ 0,002% (w/v) PMSF	<u>Puffer C₁:</u> <ul style="list-style-type: none">○ 50 mM Kaliumphosphat pH 7,5○ 0,5% (w/v) DDM

2.6 Proteincharakterisierung

2.6.1 Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie)

CD-Spektren von ETR1_TMD, ETR1_TMD-C65S-H69A und ETR1-Rezeptorvarianten wurden mit Hilfe eines Jasco-715 Spektropolarimeters und einer zylindrischen Quarzküvette (Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim) aufgenommen. Die Messungen wurden mit einer Schichtdicke von 1 mm in einem Volumen von 200 μ L (Proteinkonzentration: 0,1-0,3 mg/mL) bei RT in

Puffer C₁ bzw. C₂ durchgeführt. Die Spektren wurden mit einer Bandweite von 2 nm und einer Messgeschwindigkeit von 50 nm/min aufgenommen. Messpunkte wurden im Abstand von 1 nm zwischen 240 nm und 190 nm aufgezeichnet. Es wurden 10 Messungen akkumuliert und die erhaltenen Daten mittels CDpro ausgewertet. Die Analyse der aufgezeichneten Spektren erfolgte mit Hilfe des Programms CDPro und den Algorithmen Selcon3 und Continll (Provencher and Gloeckner 1981, Johnson 1999, Sreerama und Woody 2000). Darüber hinaus wurde das sequenzbasierte Analyseprogramm SOPMA (Geourjon und Deléage 1995) für die Auswertung hinzugezogen.

Puffer C₂:

- 50 mM Kaliumphosphat pH 8
- 0,015% (w/v) FosCholin-16

2.6.2 Bindungsstudien der Sensordomäne von ETR1 mit dem löslichen Kupferchaperon ATX1

Für Protein-Protein-Interaktionsstudien wurde die Methode der *Microscale* Thermophorese (MST) durchgeführt. Dazu wurde ATX1 mit dem fluoreszierenden Farbstoff Alexa488-NHS markiert. Dieses wurde freundlicherweise von Claudia Hoppen, ebenfalls aus dem Institut für Biochemische Pflanzenphysiologie, bereitgestellt (Hoppen, Müller et al. 2019). Die Messungen erfolgten an einem Monolith NT.115 in Puffer MST und Premiumkapillaren bei 60% MST- und 70% LED-Power. ATX1 wurde in einer finalen Konzentration von 75 nM eingesetzt, während von ETR1_TMD-C65S-H69A Verdünnungen zwischen 50 µM und 1,5 nM verwendet wurden. Die Interaktionsmessung erfolgte in Dreifachbestimmung.

Puffer MST:

- 50 mM HEPES/NaOH pH 7,5
- 300 mM NaCl
- 0,015 % (w/v) FosCholin-16
- 0,05 % (w/v) Tween20

2.7 Interaktionsstudien von Ethylenrezeptoren mit monovalentem Kupfer

2.7.1 Kupferbindung und Affinität

Für die Kupferbindungsstudie mittels $\text{BCA}_2\text{-Cu(I)}$ wurden Verdünnungsreihen von ETR1_TMD bzw. ETR1_TMD-C65S-H69A zwischen 122 μM und 60 nM bzw. 104 μM und 51 nM in einer transparenten Mikrotiterplatte angefertigt. Das Volumen jeder Probe betrug 25 μL und wurde jeweils mit 25 μL einer 1:10-Verdünnung des $\text{BCA}_2\text{-Cu(I)}$ -Reagenzes gemischt. Die Absorption der Titrationsreihe bei 562 nm wurde mit Hilfe des Infinite 200M Pro Plattenlesegeräts von Tecan bestimmt. Als Negativkontrolle wurde das als nicht kupferbindendes Protein bekannte Lysozym, sowie ein Poly-Histidin-Peptid verwendet. Darüber hinaus wurde denaturiertes ETR1_TMD titriert. Dazu wurde das Protein 30 min bei 95°C erhitzt. Alle Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt.

$\text{BCA}_2\text{-Cu(I)}$ -Reagenz:

- 50 mM TRIS/HCl pH 7,5
- 200 mM NaCl
- 2,5 mM BCA
- 1 mM CuCl
- 20 mM Ascorbat

2.7.2 Untersuchung der Kupferstöchiometrie

Zur Untersuchung der Kupfer-Rezeptor-Stöchiometrie wurde ETR1_TMD mit Kupferionen abgesättigt. Dazu wurde der Proteinlösung eine ausreichend große Menge $\text{BCA}_2\text{-Cu(I)}$ -Reagenz zugesetzt, bis eine violette Färbung in der Proteinlösung erkennbar blieb. Der Überschuss an $\text{BCA}_2\text{-Cu(I)}$ -Reagenz wurde mittels Gelfiltration (vgl. Kapitel 2.4.3) abgetrennt und die Proteinkonzentration bestimmt (vgl. Kapitel 2.4.1). Um gebundenes Kupfer wieder vom Protein zu lösen, wurden 50 μL ETR1_TMD mit einer finalen SDS-Konzentration von 20% versetzt und für 10 min bei 95°C denaturiert. Das freigesetzte Kupfer wurde mit 2 mM BCA komplexiert und die Absorption bei 562 nm gemessen. Die Kupferkonzentration wurde mit Hilfe einer Kalibriergerade ermittelt. Der Quotient aus Kupfer- und Proteinkonzentration

beschreibt das stöchiometrische Verhältnis. Alle Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt (Drees und Lübben 2016, Schott-Verdugo, Müller et al. 2019).

2.7.3 Analyse der Kupferbindung und -koordinationschemie

Zur Untersuchung der Kupferbindung und –koordinationschemie wurden in Kooperation mit Dr. George Cutsail vom Max-Planck-Institut für Chemische Energiekonversion in Mülheim a.d.R. Messungen mittels *electron paramagnetic resonance* (EPR) und Röntgenabsorptionsspektroskopie (EXAFS) durchgeführt.

Dazu wurde ETR1_TMD_Th6xHis verwendet und wie in Kapitel 2.5.1 und 2.5.2 isoliert. Der Histidin-Tag wurde über die enthaltene Thrombinschnittstelle ü.N. bei 4°C mit 10 U Thrombin (GE Healthcare, München) pro mg Protein abgetrennt. Thrombin sowie Histidin-Tag wurden anschließend mittels SEC (vgl. Kapitel 2.5.3) entfernt. Danach wurde das Protein mit dreifacher Menge des $\text{BCA}_2\text{-Cu(I)}$ -Komplex oder CuSO_4 beladen. Überschüssiges Kupfer wurde durch einen Pufferwechsel (vgl. Kapitel 2.4.3) abgetrennt.

Zur Etablierung optimaler Bedingungen für die EPR-Messungen wurden verschiedene Zusätze zu dem in Puffer A befindlichen, mit $\text{BCA}_2\text{-Cu(I)}$ -beladenen ETR1_TMD getestet. 20 mM Ascorbat sollten die Kupferionen reduziert halten, während die Zugabe von 20 mM Phenanthrolin direkt in das EPR-Röhrchen die gebundenen Kupfer(I)-Ionen zu Kupfer(II) oxidieren sollte.

2.7.4 Kupfertransferstudien von löslichen Kupferchaperonen zur Sensordomäne von ETR1

2.7.4.1 Kupferbeladung der Chaperone CCH, ATX1 und Nter-RAN1

Mittels IMAC gereinigte Kupferchaperone CCH, ATX1 und Nter-RAN1 wurden freundlicherweise von Claudia Hoppen aus dem Institut für Biochemische Pflanzenphysiologie bereitgestellt (Hoppen, Müller et al. 2019). Zur Entfernung des Histidin-Tags wurde das entsprechende Kupferchaperon mit TEV-Protease in einem Verhältnis von 1:70 ü.N. bei 4°C inkubiert. Das jeweilige Chaperon wurde mit $\text{BCA}_2\text{-Cu(I)}$ -Reagenz versetzt bis eine violette Färbung zu erkennen blieb, um das Protein mit Kupferionen

vollständig zu beladen. Der Überschuss an $\text{BCA}_2\text{-Cu(I)}$ -Reagenz, TEV-Protease und Proteinaggregate wurden mit Hilfe von Größenaustauschchromatographie und einer HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR Säule (GE Healthcare) in Puffer T vom kupferbeladenen Chaperon abgetrennt. Die Proteinkonzentration der homogenen, kupferbeladenen Chaperonfraktionen wurde bis zu einer finalen Konzentration von 400 μM erhöht (vgl. Kapitel 2.4.2)

Puffer T:

- 50 mM HEPES/NaOH pH 7,5
- 300 mM NaCl
- 0,002% (w/v)PMSF

2.7.4.2 Kupfertransfer von Kupferchaperon zu ETR1_TMD und anschließende Proteinseparation

Um einen Kupfertransfer zwischen den Kupferchaperonen und ETR1_TMD zu zeigen, wurden 250 μL einer 200 μM ETR1_TMD-Lösung an 150 mg des Säulenmaterials *Protino Ni-TED Resin* (Macherey-Nagel) gekoppelt. Dazu wurde das Säulenmaterial in Puffer A äquilibriert und mit ETR1_TMD für 1 h bei RT auf einem Taumelschüttler inkubiert. Durch Zugabe von 250 μL kupferbeladenem Chaperon (400 μM) wurde der Kupfertransfer zu ETR1_TMD für 2 h bei RT durchgeführt. Der Ansatz wurde für 1 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Säulenmaterial wurde jeweils für 30 min bei RT mit 500 μL 100 mM, 250 mM bzw. 500 mM Imidazol in Puffer A gewaschen. Wenn nötig, wurde die Proteinkonzentration für weitere Zwecke erhöht (vgl. Kapitel 2.4.2). Die Proben wurden mittels SDS-PAGE (vgl. Kapitel 2.4.4) und Westernblot (vgl. Kapitel 2.4.5) analysiert und die Protein- (vgl. Kapitel 2.4.1), sowie die Kupferkonzentration (vgl. Kapitel 2.7.2.2) bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 Heterologe Expression und Reinigung von ETR1-Rezeptorvarianten

Zur Validierung des von Stephan Schott-Verdugo und Prof. Holger Gohlke aus dem Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erstellten Strukturmodells und zur Untersuchung der Kupferbindung wurden die Transmembrandomäne von ETR1 (ETR1_TMD) sowie verschiedene Tryptophanmutanten des Vollängen-ETR1 heterolog in *E. coli* exprimiert (vgl. Kapitel 2.3.3) und anschließend isoliert. Als zusätzliches Kontrollprotein wurde ebenfalls eine Variante von ETR1_TMD mit Mutationen an den Positionen C65 und H69 exprimiert und isoliert, die nicht in der Lage sein sollte Kupfer zu binden. Während ETR1_TMD und ETR1_TMD-C65S-H69A nativ mittels IMAC und SEC gereinigt wurden, wurde für die Vollängen-ETR1-Varianten eine denaturierende Reinigungsstrategie mit anschließender Renaturierung gewählt (vgl. Kapitel 2.5). Die Ergebnisse daraus sind in Abbildung 3.1 dargestellt.

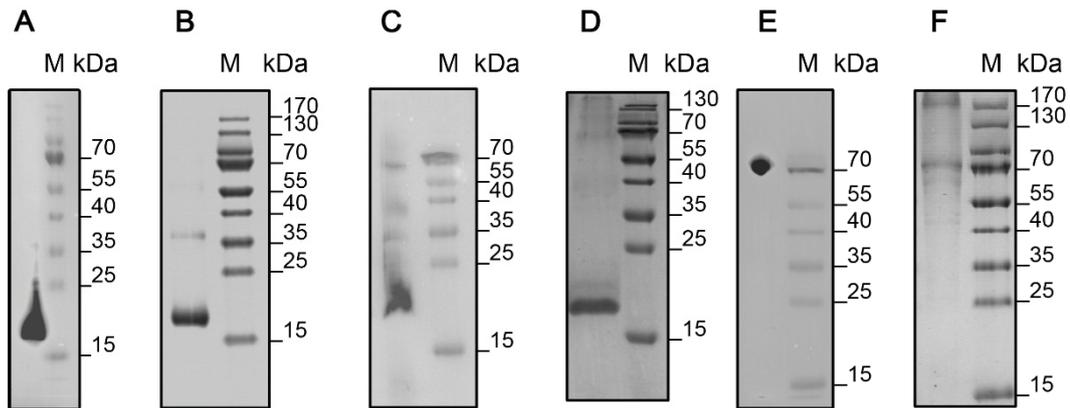


Abb. 3.1: Heterologe Expression und Isolation von ETR1_TMD, ETR1_TMD-C65S-H69A und ETR1_W-Mutanten. Der Abbildungsteil **A** zeigt einen Westernblot des Expressionsprodukts von ETR1_TMD 20 h nach der Induktion. Abbildungsteil **B** zeigt ETR1_TMD, welches mittels IMAC und SEC isoliert wurde in Form einer SDS-PAGE. Die Abbildungsteile **C** und **D** zeigen das gleiche bezüglich der Kupfermutante ETR1_TMD-C65S-H69A. **E** zeigt beispielhaft einen Westernblot der Expression von ETR1_W-Mutanten anhand der tryptophanfreien Variante von ETR1 (ETR1^{W7X}) 5 h nach der Induktion. **F** zeigt eine SDS-PAGE des denaturierend gereinigten und anschließend renaturierten ETR1^{W7X}. M bezeichnet den Größenstandard. Für die Westernblots der Expressionsproben wurde jeweils eine einer OD₆₀₀=5,6 entsprechenden Zellmenge verwendet. Es wurden jeweils 3 µg der isolierten Proteine aufgetragen.

ETR1_TMD zeigt sowohl im Westernblot nach der Expression sowie in der SDS-PAGE nach der Isolation eine prominente Bande zwischen 15 kDa und 25 kDa. Zudem konnte ETR1_TMD mit bis zu 4 mg/L Zellkultur isoliert werden. Das bei der Kupfermutante ETR1_TMD-C65S-H69A beobachtete Proteinmuster ist ähnlich. Allerdings zeigt Abbildung 3.1 C zusätzliche, schwächere Banden bei ca. 35 kDa, 40 kDa und 70 kDa. Diese in der Expressionsprobe vorhandenen Banden sind jedoch, wie in Abbildung 3.1. D zu erkennen, nach der Reinigung des Proteins nicht mehr vorhanden. Für ETR1_TMD-C65S-H69A konnten ähnliche Proteinmengen, wie für das wildtypische ETR1_TMD, isoliert werden.

Die Volllängenproteine der ETR1_W-Mutanten zeigen im Westernblot der Expression (Abb. 3.1.E) und der SDS-PAGE nach der Isolation (Abb. 3.1.F) stellvertretend für ETR1^{W7X} jeweils eine Bande bei 70 kDa. Zusätzlich tritt nach der Reinigung eine Bande bei ca. 170 kDa auf. Aufgrund der denaturierenden Reinigungsstrategie mit anschließender Renaturierung

konnten für die ETR1_W-Mutanten nur geringe, aber dennoch ausreichende Proteinmengen zwischen 0,3 und 0,5 mg/L Zellkultur isoliert werden.

Für die Aufzeichnung von EPR- und Röntgenabsorptionsspektren war es nötig, den Histidin-Tag von ETR1_TMD zu entfernen. Dazu wurde ein pET15b-Konstrukt mit C-terminalem 6xHistidin-Tag verwendet, sodass dieser durch Inkubation mit Thrombin abgespalten werden konnte. Das Konstrukt wird im Folgenden als ETR1_TMD_Th6xHis bezeichnet. Das Ergebnis aus Expression und Reinigung, sowie der Inkubation mit Thrombin ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

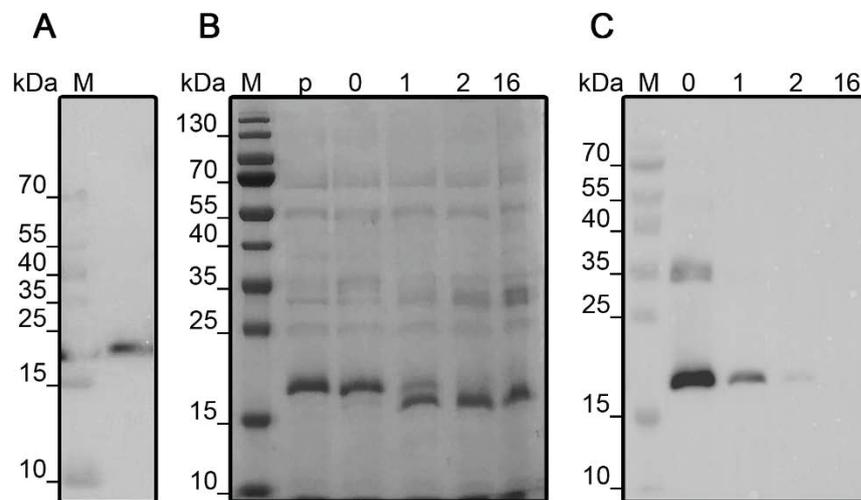


Abb. 3.2: Expression, Isolation und Inkubation mit Thrombin von ETR1_TMD_Th6xHis. Teilabbildung **A** zeigt die Expression von ETR1_TMD_Th6xHis 20 h nach der Induktion. Zur Entfernung des C-terminalen Histidin-Tags von ETR1_TMD_Th6xHis wurde das Protein mit Thrombin inkubiert. Nach 1 h (Spur 1) bzw. 2 h (Spur 2) bei RT und 16 h (Spur 16) bei 4°C wurden Proben entnommen und mittels SDS-PAGE (Teilabbildung **B**) und Westernblot (Teilabbildung **C**) analysiert. Als Vergleich diente dabei das isolierte Protein (Spur p) vor bzw. bei Zugabe (Spur 0) von Thrombin. M bezeichnet den Größenstandard. Für den Westernblot der Expressionsprobe wurde eine einer $OD_{600}=5,6$ entsprechenden Zellmenge verwendet. In allen weiteren Spuren wurden jeweils 3 μg des isolierten Proteins aufgetragen.

Abbildung 3.2 A zeigt, dass ETR1_TMD_Th6xHis exprimiert werden konnte, da eine Bande zwischen 15 kDa und 25 kDa zu erkennen ist. Allerdings ist die Proteinbande, die mit Hilfe eines Westernblots und eines C-terminalen Anti-His-Antikörper detektiert werden konnte, weniger intensiv, als die des gleichen Proteins mit N-terminalem 10xHistidin-Tag (vgl. Abb. 3.1 A). In Spur p von Teilabbildung 3.2 B ist jedoch zu erkennen, dass ETR1_TMD_Th6xHis

aus *E. coli* isoliert werden konnte und lediglich schwache Verunreinigungen in der Probe zurückbleiben. Zugabe von Thrombin bewirkt nach 1 h, dass eine zweite Bande knapp unterhalb der vorher beschriebenen Bande erkennbar wird (vgl. Abb. 3.2 B Spur 1). Nach 2 h (Spur 2 und 16 in Abb. 3.2 B) ist die obere dieser beiden Banden nicht mehr vorhanden. Der Westernblot aus Teilabbildung 3.2 C zeigt ebenfalls das isolierte ETR1_TMD_Th6xHis bei Zugabe von Thrombin (Spur 0 zwischen 15 kDa und 25 kDa). Diese Bande wird im weiteren Verlauf der Thrombin-Inkubation schwächer (Abb. 3.2 C Spur 1 und 2). Nach 16 h Inkubation mit Thrombin ist ETR1_TMD_Th6xHis mit dem C-terminalen Anti-His-Antikörper in Westernblot nicht mehr zu detektieren (Abb. 3.2 C Spur 16), was die erfolgreiche und vollständige Entfernung des Histidin-Tags belegt.

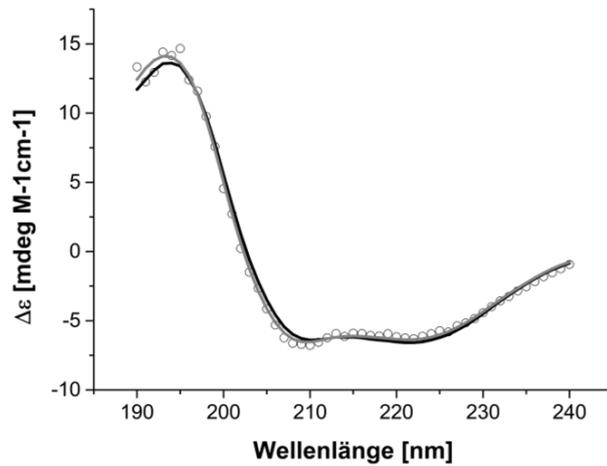
3.2 Molekulare Charakterisierung der Sensordomäne von ETR1

ETR1_TMD und dessen Kupfermutante, die nicht mehr in der Lage sein sollte Kupfer zu binden, wurden zunächst strukturell hinsichtlich ihrer korrekten Faltung mittels Circular dichroismus-Spektroskopie und funktionell mittels *Microscale* Thermophorese charakterisiert.

3.2.1 Analyse der Sekundärstrukturelemente

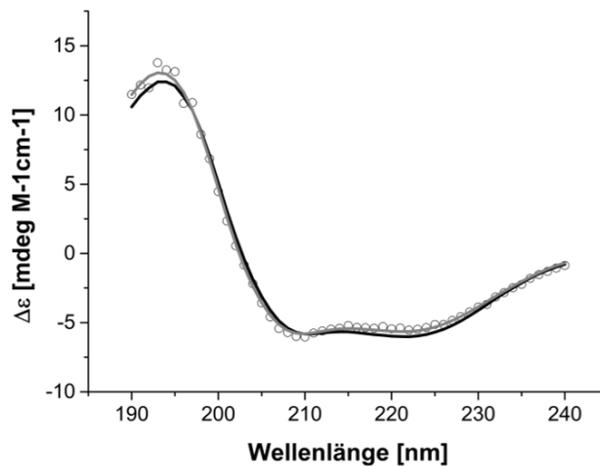
Um sicher zu stellen, dass die Proteine ETR1_TMD und ETR1_TMD-C65S-H69A in korrekter Faltung vorliegen, wurde mit ihnen eine CD-spektroskopische Analyse durchgeführt (vgl. Kapitel 2.6.1). Dabei wurde der Anteil der vorhandenen, verschiedenen Sekundärstrukturelemente aus den experimentellen, gemessenen Spektren durch das Analyseprogramm CDPPro mit Hilfe der Algorithmen Selcon3 und Continll bestimmt. In Abbildung 3.3 sind die Ergebnisse daraus sowohl graphisch als auch tabellarisch aufgeführt.

A



	α -Helix	β -Sheet	β -Turn	Random
Continll	73,7	0,8	7,4	18,1
Selcon3	73,7	0,2	7,7	18,6

B



	α -Helix	β -Sheet	β -Turn	Random
Continll	68,1	3	9,8	19,2
Selcon3	66,7	3,4	9,6	19,5

Abb. 3.3: CD-spektroskopische Analyse von ETR1_TMD und der Mutante ETR1_TMD-C65S-H69A. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der CD-spektroskopischen Analyse von ETR1_TMD (A) (weiße Kreise) und der Kupfermutante ETR1_TMD-C65S-H69A (B) (weiße Kreise). Die Spektren wurden mit einer Auflösung von 1 nm aufgezeichnet, wobei 10 Spektren akkumuliert wurden. Die zur Analyse der Graphen herangezogenen Algorithmen Continll (graue Kurve) und Selcon3 (schwarze Kurve) ergeben hohe α -helikale Anteile von 73,7% für ETR1_TMD und 68,1% bzw. 66,7% für die Kupfermutante.

Sowohl ETR1_TMD als auch ETR1_TMD-C65S-H69A zeigen im CD-Spektrum jeweils ein absolutes Minimum bei 210 nm und ein relatives Minimum bei 222 nm, sowie ein absolutes Maximum bei ca. 195 nm. Die Bestimmung der sekundären Strukturelemente mit Hilfe der Algorithmen Continll und Selcon3 liefert einen überwiegend α -helikalen Strukturanteil. Dazu wurden die gemessenen Daten um die eingesetzte Proteinkonzentration und die Anzahl der Aminosäurereste korrigiert und die molare Elliptizität gegen die Wellenlänge aufgetragen. Für ETR1_TMD ergibt sich so in beiden Fällen ein α -helikaler Anteil von 73,7%. Die mutierte Variante des Proteins weist einen α -helikalen Anteil von 68,1% (Continll) bzw. 66,7% (Selcon3) auf. Darüber hinaus ist in der graphischen Darstellung in Abbildung 3.3 zu erkennen, dass die mittels Continll und Selcon3 erstellten Kurven und die experimentell gemessene Kurve kaum voneinander abweichen. Auch das sequenzbasierte Vorhersageprogramm SOPMA gibt einen sehr hohen α -helikalen Anteil für beide Proteine von ca. 68% an.

3.2.2 Bindungsstudien der Sensordomäne von ETR1 mit ATX1

Die Interaktion zwischen ATX1 und ETR1_TMD konnte in Bindungsstudien mittels *Microscale* Thermophorese (MST) bereits nachgewiesen werden (Hoppen, Müller et al. 2019). Beide Proteine zeigen eine hochaffine Wechselwirkung, die durch eine Dissoziationskonstante von 313 ± 74 nM charakterisiert ist. Um zu bestätigen, dass auch die Kupfermutante ETR1_TMD-C65S-H69A in der Lage ist mit ATX1 zu interagieren, wurde mit ihr und Alexa488 markiertem ATX1 ebenfalls eine solche Interaktionsstudie mittels MST durchgeführt (vgl. Kapitel 2.6.2). Die daraus resultierenden Daten sind im Vergleich zu den für ETR1_TMD und ATX1 bestimmten Daten in Abbildung 3.4 dargestellt.

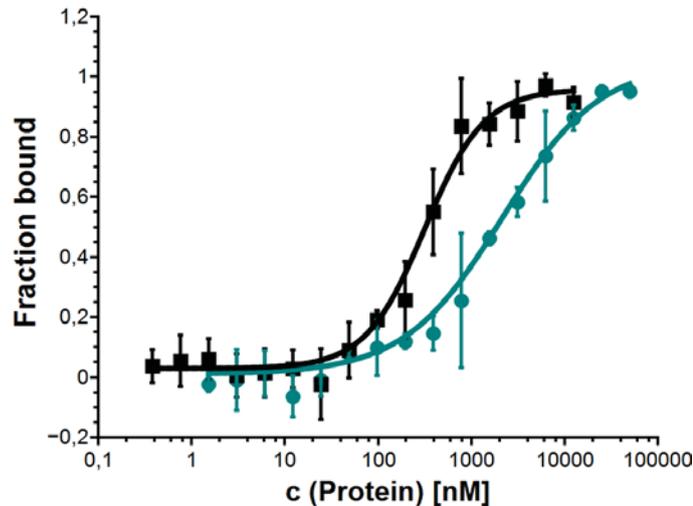


Abb. 3.4: Interaktionsstudie zwischen ATX1-Alexa488 und ETR1_TMD-C65S-H69A mittels *Microscale* Thermophorese im Vergleich zu ETR1_TMD. Die Abbildung zeigt die Interaktion zwischen dem Alexa488-markierten Kupferchaperon ATX1 und der Kupfermutante ETR1_TMD-C65S-H69A (grüne Kurve), die mittels *Microscale* Thermophorese bestimmt wurde. Die gemessene Dissoziationskonstante (K_D) für diese Interaktion liegt bei 2137 ± 343 nM. Im Vergleich dazu liegt der von Hoppen et al. (2019) bestimmte K_D zwischen ATX1 und ETR1_TMD (schwarze Kurve) bei 313 ± 74 nM (Hoppen, Müller et al. 2019). Die Messung erfolgte in Dreifachbestimmung.

Genau wie die bereits gemessene Interaktion zwischen ETR1_TMD und mit Alexa488 markiertem ATX1 mit einem K_D von 313 ± 74 nM (Abbildung 4.2, schwarze Kurve), zeigt auch ETR1_TMD-C65S-H69A eine Interaktion mit ATX1 (Abbildung 4.2, grüne Kurve). Diese besitzt einen K_D von 2137 ± 343 nM und ist demnach um einen Faktor von ca. 7 schwächer.

3.3 Kupferbindung und -stöchiometrie

Für die Erstellung eines hochauflösenden Strukturmodells der Transmembrandomäne von ETR1 war es zunächst von Bedeutung zu klären, in welcher Stöchiometrie der Kupfer(I)-Kofaktor an die Transmembrandomäne bindet. Daher wurde die Kupferstöchiometrie mit Hilfe des heterolog exprimierten, detergentz-solubilisierten und isolierten ETR1_TMD *in vitro* geklärt. Dazu wurde das Protein mit Kupfer(I)-Ionen beladen, indem der violett gefärbte $\text{BCA}_2\text{-Cu(I)}$ -Komplex hinzugegeben wurde. Die vollständige Beladung des Proteins wurde erreicht, sobald eine violette Färbung in der Lösung zurückblieb. Der Überschuss an $\text{BCA}_2\text{-Cu(I)}$ -

Reagenz wurde mittels Gelfiltration abgetrennt. An das Protein gebundene Kupfer(I)-Ionen wurden durch Denaturierung wieder freigesetzt und mit BCA rekombiniert (vgl. Kapitel 2.7.2). Die erneut entstandene violette Färbung wurde mit Hilfe einer Kalibriergerade quantifiziert, da sie die an das Protein gebundene Menge Kupfer(I)-Ionen widerspiegelt. Abbildung 3.5 zeigt die verwendete Kalibriergerade und die daraus berechnete Menge Kupfer(I)-Ionen, die an ETR1_TMD gebunden ist.

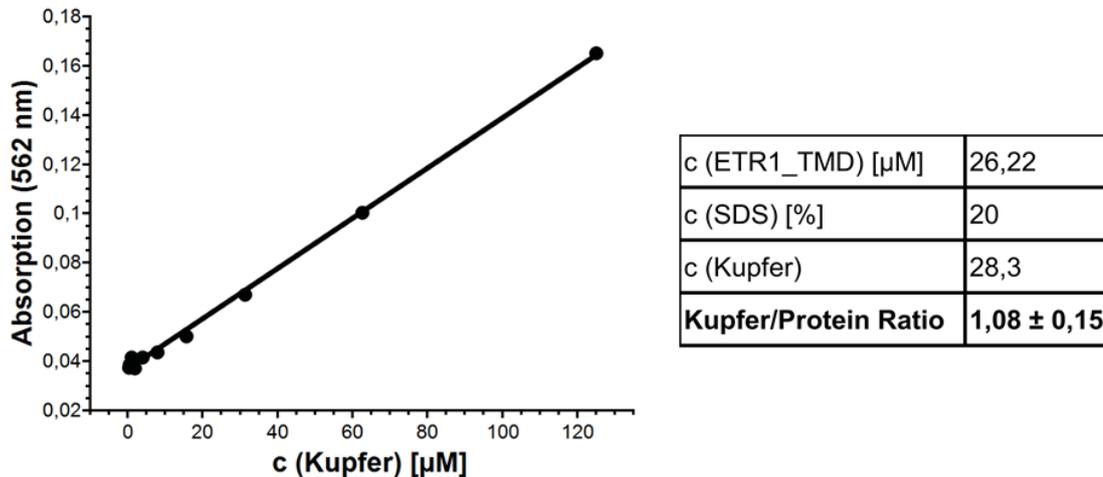


Abb. 3.5: Bestimmung der Kupferstöchiometrie von ETR1_TMD. Die Abbildung zeigt die zur Quantifizierung der rekombinierten Kupferionen verwendete Kalibriergerade mit der Geradengleichung $y = 0,001 x + 0,0373$. Es wurde die Absorption bei 562 nm gegen die Kupferkonzentration in µM aufgetragen. Darin ebenfalls dargestellt ist das stöchiometrische Verhältnis von Kupfer(I)-Ionen und ETR1_TMD von $1,08 \pm 0,15$.

Es wurde eine Kupfer(I)-Menge von 28,3 µM nach chemischer (20% SDS) und thermischer (95°C) Denaturierung von ETR1_TMD bestimmt. In Anbetracht der eingesetzten Proteinkonzentration von 26,22 µM ergibt das ein Kupfer/Protein-Verhältnis von $1,08 \pm 0,15$.

In Bezug auf ETR1_TMD wurde die Affinität zu Kupfer(I)-Ionen in einem Titrationsexperiment adressiert. Auch hier wurden die Kupfer(I)-Ionen mit dem Kupferchelator BCA in der monovalenten Form stabilisiert. Allerdings wurde nun die Abnahme der Absorption bei 562 nm bei steigender ETR1_TMD-Konzentration betrachtet. Unter gleichen Bedingungen wurden das Protein Lysozym und ein Poly-Histidin-Peptid titriert. Abbildung 3.6 zeigt die Abnahme der Absorption als eine Funktion der Proteinkonzentration.

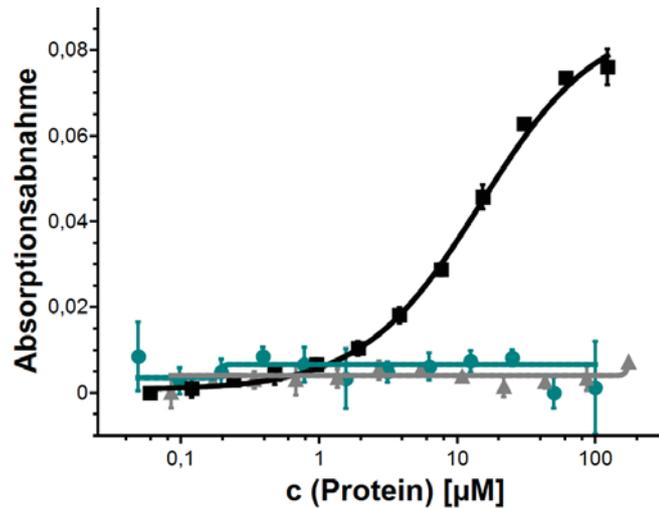


Abb. 3.6: Untersuchung der Kupferbindung von ETR1_TMD. In der Abbildung ist die Absorptionsabnahme als eine Funktion der Proteinkonzentration von ETR1_TMD (schwarze Kurve) dargestellt. Gemessen wurde für jeden Datenpunkt die Absorption des $\text{BCA}_2\text{-Cu(I)}$ -Komplexes bei 562 nm. Ebenfalls wurden das Protein Lysozym (graue Kurve) und ein Poly-Histidin-Peptid (grüne Kurve) auf gleiche Weise titriert. Jede Titration wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt.

Die Titrationsdaten zeigen, dass es bei steigender ETR1_TMD-Konzentration zu einer Abnahme der Absorption bei 562 nm kommt. Aus dieser Bindungskurve wurde eine Dissoziationskonstante (K_D) berechnet. Basierend auf früheren Studien, dass die Ethylenrezeptorfamilie Dimere als kleinste funktionelle Einheit bildet (Shakeel, Wang et al. 2013), setzt sich das in Abbildung 3.6 für ETR1_TMD dargestellte Bindungsereignis



aus den folgenden zwei Gleichungen zusammen:



und



Die Gleichgewichtskonstante für Gleichung 3 ist dann:

$$\begin{aligned}
 K_R &= \frac{[(ETR1\ TMD)_2 - Cu(I)_2] [BCA]^4}{[(ETR1\ TMD)_2] [(BCA)_2 - Cu(I)]^2} \\
 &= \frac{[(ETR1\ TMD)_2] [Cu]^2 [BCA]^4}{K_D (ETR1\ TMD)_2 - Cu(I)_2 [(ETR1\ TMD)_2] [(BCA)_2 - Cu(I)]^2} \\
 &= \frac{1}{K_D (ETR1\ TMD)_2 - Cu(I)_2 \beta_2 [(BCA)_2 - Cu(I)]^2}
 \end{aligned}$$

Gl. 4

Mit Hilfe von K_R aus Gleichung 4 kann dann unter Berücksichtigung der Bildungskonstanten von $BCA_2-Cu(I)$ ($\beta_2 = 2 \times 10^{17} M^{-2}$) (Xiao, Donnelly et al. 2008) der K_D berechnet werden:

$$\begin{aligned}
 K_{D(ETR1\ TMD)_2 - Cu(I)_2} &= \frac{1}{K_R \beta_2 [(BCA)_2 - Cu(I)]^2} \\
 &= \frac{1}{1,5 \times 10^{-5} M^2 \times 4 \times 10^{34} M^{-4}} = 1,7 \times 10^{-30} M^2
 \end{aligned}$$

Gl. 5

Bezogen auf ein Proteindimer ergibt sich demnach ein $K_{D(ETR1\ TMD)_2 - Cu(I)_2}^{1/2} = 1,3 \times 10^{-15} M$.

Gleichzeitig wurden die Daten von ETR1_TMD mit einem Hill-Modell angepasst. Dabei konnte für die Titration von ETR1_TMD mit Kupfer(I)-Ionen ein Hill-Koeffizient von $h = 1,07 \pm 0,07$ bestimmt werden.

Wie in Abbildung 3.6 ebenfalls zu erkennen ist, zeigt das Protein Lysozym, sowie das Poly-Histidin-Peptid anders als ETR1_TMD keine Abnahme der Absorption von $BCA_2-Cu(I)$ bei steigenden Protein- bzw. Peptidkonzentration.

Zusätzlich zur Protein-Protein-Interaktionsstudie mit ATX1 wurde mit der Kupfermutante ETR1_TMD-C65S-H69A auch das Titrationsexperiment mit Hilfe des $BCA_2-Cu(I)$ -Komplexes durchgeführt, wie es bereits für ETR1_TMD dargestellt wurde (vgl. Abbildung 3.6). Abbildung 3.7 zeigt das daraus erhaltene Ergebnis.

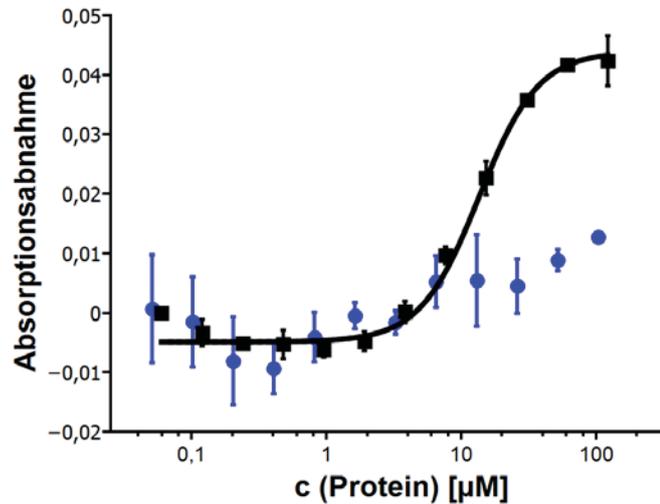


Abb. 3.7: Untersuchung der Kupferbindung von ETR1_TMD-C65S-H69A. Dargestellt ist die Absorptionsabnahme als eine Funktion der Proteinkonzentration von ETR1_TMD-C65S-H69A (blaue Punkte). Gemessen wurde für jeden Datenpunkt die Absorption des $\text{BCA}_2\text{-Cu(I)}$ -Komplexes bei 562 nm. Zu Vergleichszwecken wurden die Daten bezüglich ETR1_TMD (schwarze Kurve) aufgetragen. Beide Datensätze wurden um die Werte von denaturiertem ETR1_TMD korrigiert. Jede Titration wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt.

Auch die Kupfermutante ETR1_TMD-C65S-H69A zeigt eine Reaktion auf den $\text{BCA}_2\text{-Cu(I)}$ -Komplex. Mit steigender Proteinkonzentration ist auch hierbei eine Absorptionsabnahme des violetten Kupferkomplexes zu beobachten, was gleichzeitig auch für denaturiertes ETR1_TMD zutrifft (Daten nicht gezeigt). Werden die Datensätze von ETR1_TMD und ETR1_TMD-C65S-H69A jedoch um den Datensatz des denaturierten, wildtypischen ETR1_TMD korrigiert (vgl. Abbildung 3.7), ist für ETR1_TMD-C65S-H69A nur noch eine sehr geringe Absorptionsabnahme mit hoher Standardabweichung zu erkennen. Ebenfalls ist hier kein sigmoidaler Kurvenverlauf festzustellen, weshalb für ETR1_TMD-C65S-H69A keine Dissoziationskonstante bestimmt werden konnte. Der berechnete K_D -Wert für ETR1_TMD ändert sich durch die Subtraktion der Daten des denaturierten ETR1_TMD nicht.

3.4 Analyse der Kupferbindung mittels EPR-Spektroskopie

Die Kupferbindung von ETR1_TMD wurde fortführend zu den in Kapitel 3.3 gezeigten Titrations- und Stöchiometrieexperimenten auch mittels EPR-Spektroskopie analysiert. Diese Messungen wurden von Dr. George Cutsail vom Max-Planck-Institut für Chemische Energiekonversion in Mülheim a.d.R. durchgeführt. In Abbildung 3.8 sind die aufgenommenen EPR-Spektren sowie die zur Quantifizierung der enthaltenen Kupfer(II)-Ionen verwendete Kalibriergerade dargestellt.

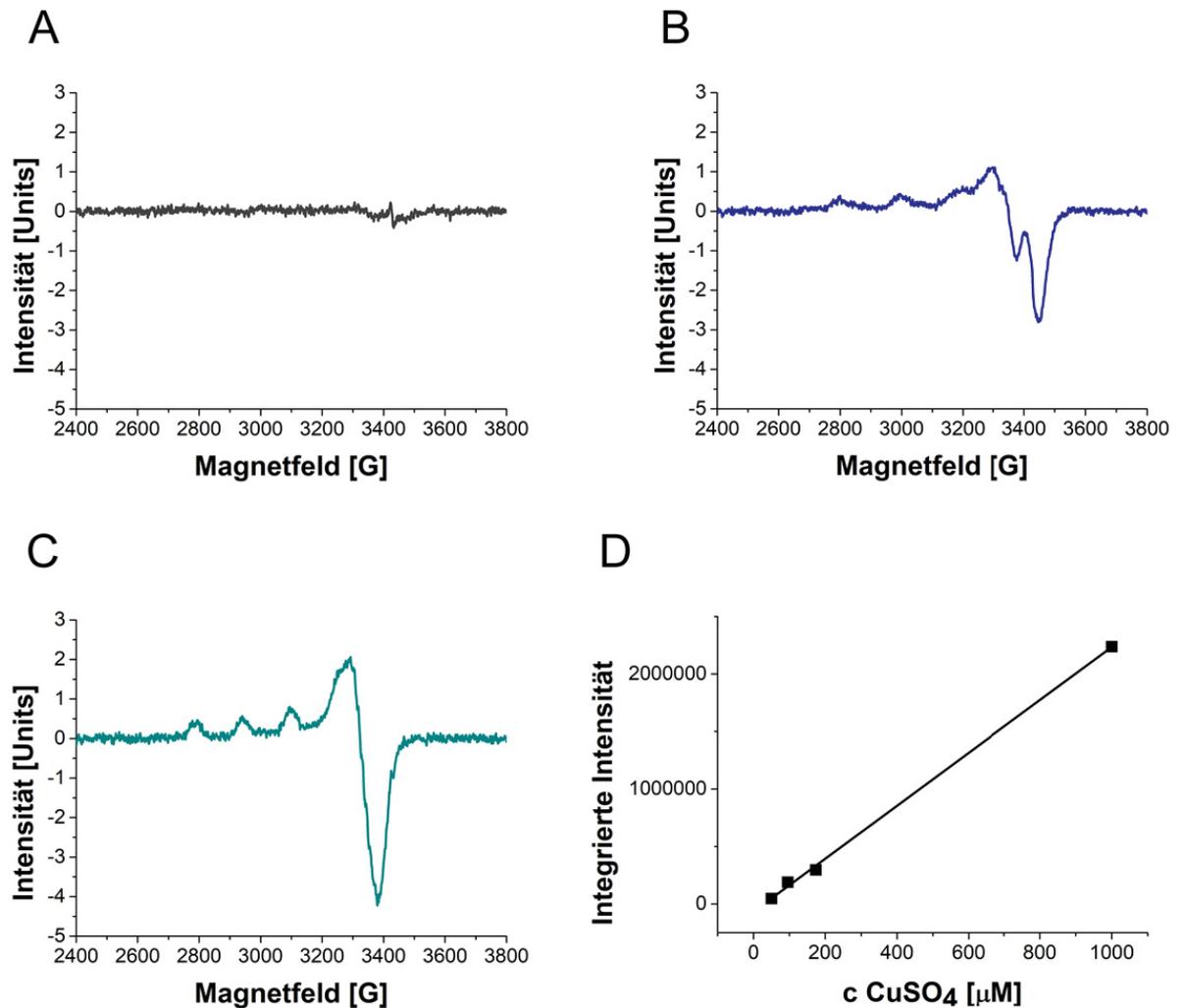


Abb. 3.8. Analyse der Kupferbindung von ETR1_TMD mittels EPR-Spektroskopie. Die Abbildung zeigt drei EPR-Spektren von ETR1_TMD nach unterschiedlicher Behandlung mit Kupferionen. Die Spektren wurden jeweils von 2400 bis 3800 G aufgezeichnet und die Intensität gegen das Magnetfeld [G] aufgetragen. **A** zeigt das EPR-Spektrum von ETR1_TMD, das mit Hilfe des BCA₂-Cu(I)-Komplexes beladen und durch Ascorbat in reduzierter Form gehalten wurde. In **B** ist das EPR-Spektrum durch CuSO₄ beladenen ETR1_TMDs dargestellt. In Abbildungsteil **C** ist dasselbe Protein wie in A gezeigt. Jedoch wurde es nach der in A gezeigten Messung im EPR-Messröhrchen mit Phenanthrolin behandelt. In allen drei Fällen wurden 300 μM Protein eingesetzt. In **D** ist die Kalibriergerade ($y = 2301x - 66747$), die zur Quantifizierung von enthaltenen Kupfer(II)-Ionen verwendet wurde, dargestellt.

Abbildung 3.8 zeigt drei verschiedene EPR-Spektren von ETR1_TMD. In Teilabbildung A ist kein Signal von Kupfer im Magnetfeld zu erkennen. Hier wurde ETR1_TMD mit Hilfe des BCA₂-Cu(I)-Komplex beladen und durch Ascorbat in reduzierter Form gehalten. Bei Beladung von ETR1_TMD mit CuSO₄ (Abbildungsteil B), zeigt das EPR-Spektrum ein Signal. Dieses besitzt

ein absolutes Maximum bei ca. 3298 G und ein absolutes Minimum bei ca. 3447 G. Relative Maxima sind bei 2799 G, 2995 G und 3198 G zu sehen. Ein weiteres relatives Minimum liegt bei 3376 G. Gleichzeitig konnte durch Integration des Kurvenverlaufs und mit Hilfe der Kalibriergeraden in Abbildungsteil D die Kupfer(II)-Konzentration in dieser Messung auf 55,16 μM quantifiziert werden. Wenn dasselbe Protein, das bereits für die in A gezeigte Messung im EPR-Röhrchen mit Phenanthrolin behandelt wird, kann ein Kupfer(II)-Signal gemessen werden (Teilabbildung C). Dieses zeigt im Gegensatz zu der in B gezeigten Kurve einen definierteren Kurvenverlauf mit einem absoluten Maximum bei 3292 G und einem Minimum bei 3369 G. Gleichzeitig besitzt das Spektrum relative Maxima bei 2778 G, 2941 G und 3095 G. Darüber hinaus zeigt die Kurve im abfallenden Bereich zwischen dem absoluten Maximum und dem Minimum ein sich wiederholendes Muster mit geringen Ausschlägen. Aus diesem Spektrum konnte mit Hilfe der Kalibriergeraden (Teilabbildung D) eine Kupfer(II)-Konzentration von 56,58 μM berechnet werden.

3.5 Kupfertransferstudien der Kupferchaperonen ATX1 und CCH sowie Nter-RAN1 zu ETR1_TMD

Um die Kupferbeladung von ETR1_TMD und den Transfer des Kofaktors vom Kupferchaperon zur vorgesehenen Bindestelle am Ethylenrezeptor genauer untersuchen zu können, wurden die löslichen Kupferchaperone CCH, ATX1 sowie der N-terminale Teil der P-Type-ATPase RAN1 von Claudia Hoppen aus dem Institut für Biochemische Pflanzenphysiologie heterolog in *E. coli* exprimiert und isoliert zur Verfügung gestellt (Hoppen, Müller et al. 2019). Darüber hinaus wurde zu Kontrollzwecken die Mutante ETR1_TMD-C65S-H69A verwendet. Ebenfalls als Kontrolle wurde der Inhibitor DC_AC50 verwendet, der den Übertrag von Kupferionen beim humanen ATX1-Homolog Atox1 auf das Zielprotein verhindert (Wang, Luo et al. 2015). Hier sollte analysiert werden, ob dieser Inhibitor auch den Übertrag des Kofaktors von den pflanzlichen Kupferchaperonen ATX1 bzw. CCH auf ETR1_TMD unterbindet.

Zur Analyse eines potenziellen Kupfertransfers von einem Kupferchaperon zur Transmembrandomäne des Ethylenrezeptors ETR1, wurde das jeweilige Chaperon (CCH, ATX1 oder Nter-RAN1) mit Hilfe des $\text{BCA}_2\text{-Cu(I)}$ -Komplexes mit Kupfer beladen. Überschüssiges $\text{BCA}_2\text{-Cu(I)}$ -Reagenz, das durch eine violette Färbung in der Lösung angezeigt wird, sowie freies BCA wurden anschließend mittels SEC vom kupferbeladenen Chaperon getrennt. An Nickel-TED gebundenes ETR1_TMD wurde anschließend mit dem kupferbeladenen Chaperon für einen Kupfertransfer inkubiert. Durch verschiedene Waschschrte wurden beide Proteine wieder voneinander getrennt. In Abbildung 3.9 sind beide Proteine sowohl vor als auch nach der Inkubation mittels Westernblot und SDS-PAGE dargestellt.

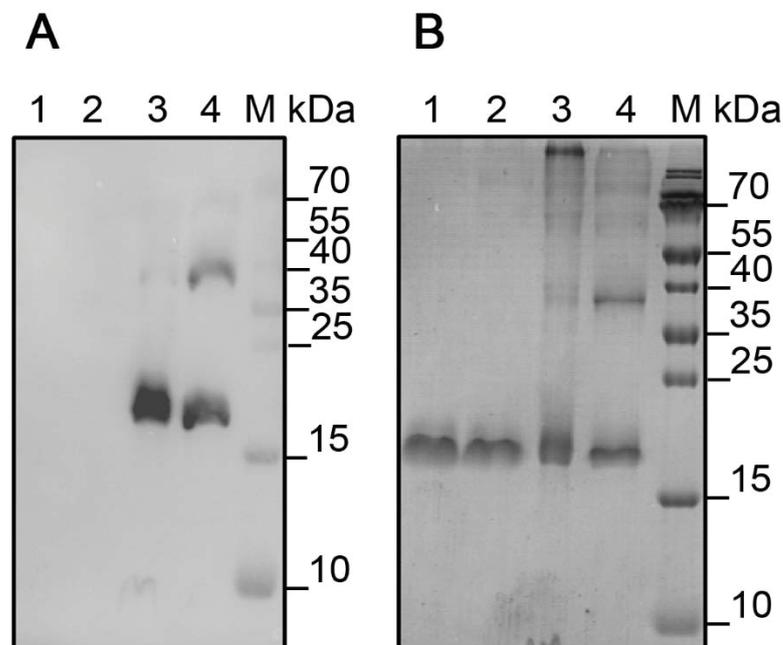


Abb. 3.9: Westernblot (A) und SDS-PAGE (B) der Trennung von Kupferchaperon und ETR1_TMD nach gemeinsamer Inkubation am Beispiel von CCH. Die Abbildung zeigt die Trennung des jeweiligen Kupferchaperons (am Beispiel von CCH) von ETR1_TMD, nachdem beide Proteine für einen potenziellen Kupfertransfer gemeinsam inkubiert wurden. Gezeigt sind jeweils sowohl ein Westernblot (A) sowie eine SDS-PAGE (B). In Spur 1 ist das Chaperon vor der Inkubation mit ETR1_TMD, aber nach der Abtrennung des Histidin-Tags dargestellt. Spur 2 zeigt das gleiche Protein nach Inkubation mit ETR1_TMD. ETR1_TMD ist ebenfalls vor (Spur 3) und nach (Spur 4) der Inkubation aufgetragen. M bezeichnet den Größenstandard. Es wurden je 3 μg Protein verwendet.

Nach der Inkubation, bei der ein Kupfertransfer zwischen dem Chaperon und ETR1_TMD stattfinden konnte, wurden die Proteine mittels IMAC erfolgreich voneinander getrennt. Abbildung 3.9 A zeigt die Trennung der Proteine CCH, stellvertretend für die verwendeten Chaperone, und ETR1_TMD mittels Westernblot. Da das Chaperon keinen Histidin-Tag mehr besitzt, reagiert es auch nicht auf den Anti-His-Antikörper, der im Westernblot verwendet wurde. Daher ist in den beiden Spuren 1 und 2 kein Signal zu erkennen. In der SDS-PAGE jedoch, ist auf der Höhe von ca. 20 kDa eine prominente Bande zu erkennen. Es kann also davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Banden in Spur 1 und 2 um CCH handelt. Gleichzeitig ist vor allem im Westernblot in Spur 2 abzulesen, dass die Trennung von CCH und ETR1_TMD erfolgreich verlief, da kein ETR1_TMD, das auf den Anti-His-Antikörper reagieren würde, in Spur 2 vorhanden ist. Ebenso ist in der SDS-PAGE keine entsprechende Bande mit der Größe von ca. 20 kDa, wie es für ETR1_TMD zu erwarten wäre, vorhanden. Ebenso liegt in Spur 4 nur ETR1_TMD ohne Verunreinigungen durch CCH vor. Da keine Doppelbande auf der Höhe von ca. 20 kDa in der SDS-PAGE zu erkennen ist, ist davon auszugehen, dass kein CCH in der ETR1_TMD-Probe nach gemeinsamer Inkubation zurückgeblieben ist, das die Bestimmung der Kupferkonzentration in dieser Probe verfälschen könnte. Nicht nur die Trennung von CCH und ETR1_TMD verlief erfolgreich. Das gleiche Ergebnis konnte auch für ATX1 bzw. Nter-RAN1 und ETR1_TMD erzielt werden. Westernblot und SDS-PAGE der Trennung von ATX1 bzw. Nter-RAN1 von ETR1_TMD sind dem Anhang in Kapitel 7.6 zu entnehmen.

Nach dem Kupfertransfer von CCH, ATX1 oder Nter-RAN1 auf ETR1_TMD wurde in ETR1_TMD die Kupferkonzentration bestimmt. Als Vergleichswert diente dafür die Kupferkonzentration in ETR1_TMD vor dem Transferexperiment. Gleiches wurde mit dem Inhibitor DC_AC50, der mit dem Chaperon vor dem Transfer inkubiert wurde, und der Kupfermutante ETR1_TMD-C65S-H69A durchgeführt. In Abbildung 3.10 sind die Ergebnisse dieser Messung als Balkendiagramm dargestellt.

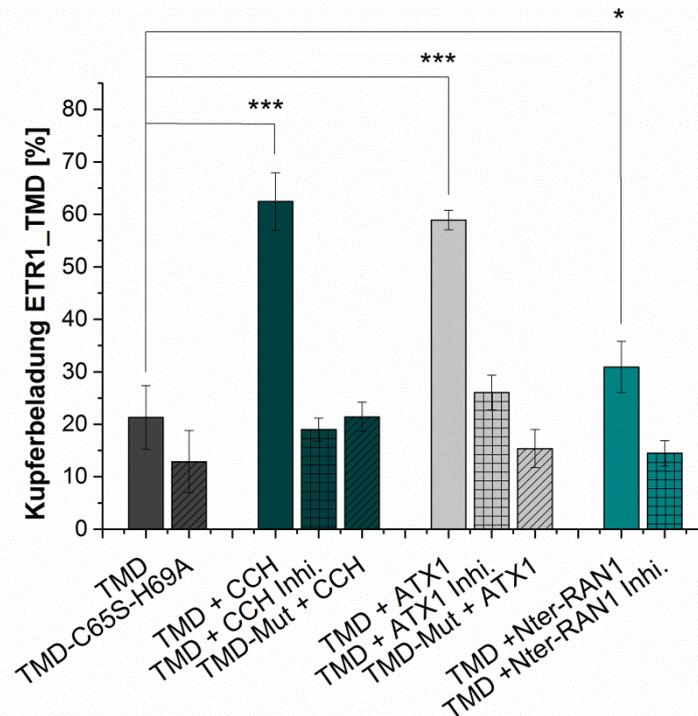


Abb. 3.10: Kupfertransfer von CCH, ATX1 oder Nter-RAN1 zu ETR1_TMD bzw. ETR1_TMD-C65S-H69A. Die Abbildung zeigt die Kupferbeladung von ETR1_TMD in % nach dem Kupfertransfer-Experiment, in dem ETR1_TMD mit einem beladenen Kupferchaperon inkubiert wurde. Gezeigt ist sowohl die Beladung von ETR1_TMD und ETR1_TMD-C65S-H69A vor und nach dem Kupfertransfer durch CCH, ATX1 oder Nter-RAN1. Außerdem ist die Kupferbeladung von ETR1_TMD gezeigt, nach dem die Chaperone mit dem Inhibitor DCAC_50 inkubiert wurden ($*P \leq 0,05$; $***P \leq 0,01$). In allen Messungen wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt

Nach der erfolgreichen Trennung der Chaperone von ETR1_TMD nach erfolgter Inkubation (vgl. Abbildung 3.9), wurde in ETR1_TMD die Kupferkonzentration bestimmt. Dazu wurde ETR1_TMD sowohl chemisch mittels einer finalen SDS-Konzentration von 20% als auch thermisch durch Erhitzen bei 95°C denaturiert. Die dabei frei gesetzten Kupferionen wurden mit BCA rekomplexiert und mit Hilfe einer Kalibriergerade quantifiziert. Als Referenzwert diente dabei ETR1_TMD bzw. ETR1_TMD-C65S-H69A, das nicht mit einem Chaperon inkubiert wurde. Abbildung 3.10 zeigt einen signifikanten Anstieg der Kupferkonzentration in ETR1_TMD, nachdem das Protein mit kupferbeladenem CCH, ATX1 oder Nter-RAN1 inkubiert wurde. Nach Inkubation mit CCH oder ATX1 steigt die Kupferkonzentration von 20% auf ca. 60% an. Bei Nter-RAN1 steigt sie dagegen auf 35%. Wurden die Chaperone vorab mit dem potenziellen Inhibitor DC_AC50 behandelt, ist in

allen drei Fällen kein signifikanter Anstieg der Kupferkonzentration in ETR1_TMD zu verzeichnen. Die Kupferkonzentration in ETR1_TMD liegt dann im Falle von ATX1 nach der Inkubation bei maximal 25%. Ein Anstieg der Kupferkonzentration bleibt ebenfalls aus, wenn die Kupfermutante ETR1_TMD-C65S-H69A als Transferpartner für die Chaperone CCH und ATX1 verwendet wurde. Die als Ausgangswert betrachtete Kupferkonzentration von ETR1_TMD-C65S-H69A liegt vor der Inkubation mit einem Chaperon bei ca. 12% und ist damit um ca. 9% geringer als bei ETR1_TMD. Nach Inkubation mit kupferbeladenem CCH liegt sie bei 20%, nach Inkubation mit ATX1 bei 15%. In beiden Fällen ist der verzeichnete Anstieg der Kupferkonzentration bei ETR1_TMD-C65S-H69A nicht signifikant.

3.5.1 Kupferbeladung der Sensordomäne von ETR1

Da in keinem dieser Transferexperimente eine Kupferbeladung von 100% bei ETR1_TMD erreicht werden konnte, obwohl doppelt so viel Chaperon im Vergleich zu ETR1_TMD eingesetzt wurde, wurde untersucht, ob andere Beladungsstrategien ein vergleichsweise besseres Beladungsergebnis hervorbringen. Abbildung 3.11 zeigt die Beladung mit Kupfer von ETR1_TMD nach Beladung mit unterschiedlichen Kupferdonatoren.

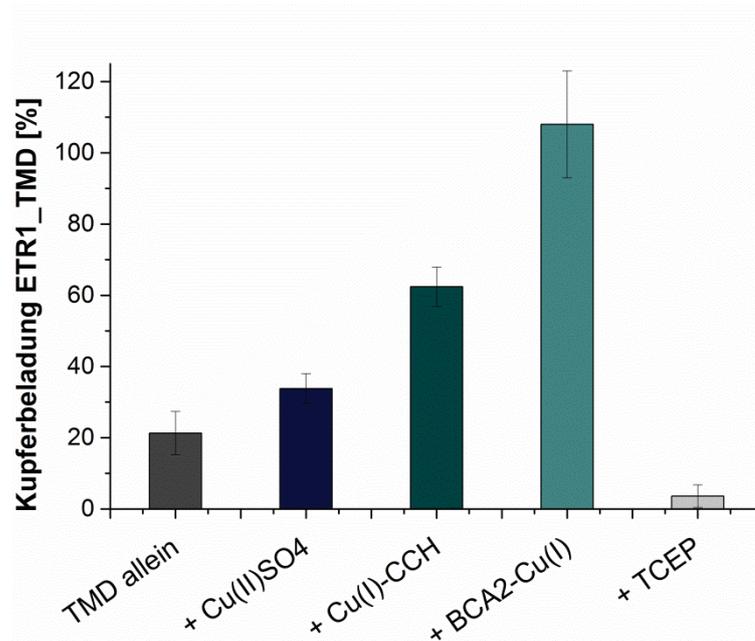


Abb. 3.11: Kupferbeladung von ETR1_TMD. Die Abbildung zeigt die Beladung von ETR1_TMD aus unterschiedlichen Kupferquellen in %. Wurde ETR1_TMD nach der Expression nicht mit Kupfer behandelt, liegen bereits ca. 20% der Rezeptordomäne mit Kupfer beladen vor (dunkelgrauer Balken). Behandlung mit dem Reduktionsmittel TCEP führt zu einer Kupferbeladung von 3,6% (hellgrauer Balken). ETR1_TMD, das mit Cu(II)SO₄ behandelt wurde, zeigt eine Beladung mit Kupfer von 34% (dunkelblauer Balken), während der Beladungsvorgang mittels Kupfer-beladenem CCH ETR1_TMD zu ca. 62% (dunkelgrüner Balken) beladen kann. Durch BCA-komplexierte Kupfer(I)-Ionen kann ETR1_TMD vollständig, also zu 100% (grüner Balken) beladen werden.

Wird ETR1_TMD heterolog in *E. coli* exprimiert und daraus isoliert, liegen bereits ca. 20% des Rezeptors mit Kupfer beladen vor. Im Rahmen dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass mit Hilfe eines Kupferchaperon ETR1_TMD zu 60% beladen werden kann. Wird ETR1_TMD mit CuSO₄ als Quelle für Kupfer(II)-Ionen beladen, steigt die Kupferkonzentration in ETR1_TMD auf ca. 32% an (Abbildung 3.11). Die Beladung von ETR1_TMD mit dem BCA₂-Cu(I)-Komplex, wie es schon zur Ermittlung der Kupfer/Protein-Stöchiometrie gezeigt wurde (vgl. Kapitel 3.3), bringt zu 100% beladenes Rezeptorprotein hervor. Wurde ETR1_TMD mit TCEP behandelt, sinkt die Kupferbeladung darin um ca. 16% auf 3,6%.

3.6 Analyse der Kupferkoordinationschemie in ETR1_TMD mittels Röntgenabsorptionsspektroskopie (XAS)

Zur Identifizierung der Kupferbindungsstelle in ETR1_TMD wurde Röntgenabsorptionsspektroskopie in Kooperation mit Dr. George Cutsail vom Max-Planck-Institut für Chemische Energiekonversion in Mülheim a.d.R. durchgeführt. Die diesbezüglich erhaltenen und hier vorgestellten Daten wurden am *Stanford Synchrotron Radiation Lightsource* (SSRL) aufgezeichnet. In Abbildung 3.12 ist das aufgenommene Röntgenabsorptionsspektrum und eine damit durchgeführte multiple Komponentenanalyse (MCA) dargestellt.

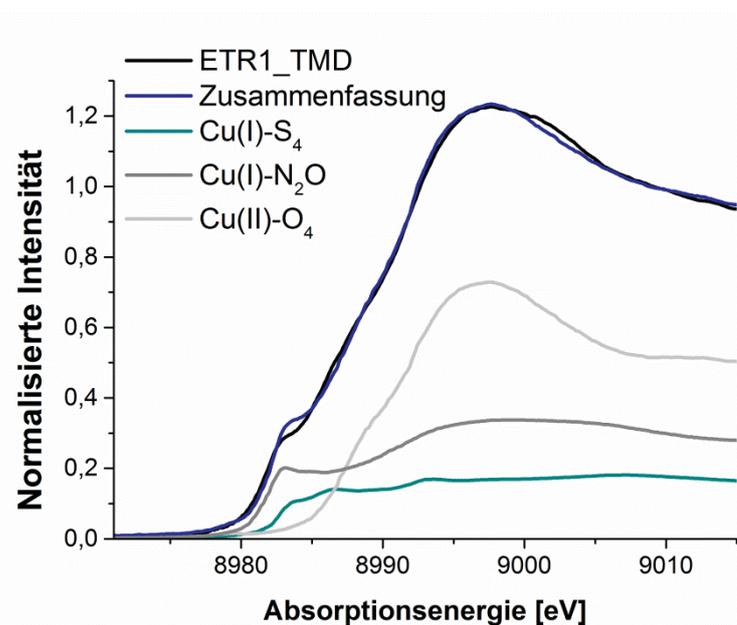


Abb. 3.12: Röntgenabsorptionsspektrum von ETR1 und multiple Komponentenanalyse (MCA). Die Abbildung zeigt das aufgenommene Röntgenabsorptionsspektrum von ETR1_TMD (schwarze Kurve). Dabei wurde die normalisierte Intensität gegen die Absorptionsenergie in eV aufgetragen. Ebenfalls ist die Zusammenfassung einer MCA (blaue Kurve) dargestellt. Diese enthält drei Bestandteile, die durch die weiteren Kurven des Graphen beschrieben werden. Diese stellen Modellsysteme für eine Cu(I)-S₄- (grüne Kurve), eine Cu(I)-N₂O- (dunkelgraue Kurve) und eine Cu(II)-O₄-Koordination (hellgraue Kurve) dar.

In Abbildung 3.12 ist das gemessene Röntgenabsorptionsspektrum von ETR1_TMD gezeigt (schwarze Kurve). Sie besitzt ein absolutes Maximum bei ca. 8998 eV und eine Schulter im Bereich zwischen 8980 eV und 8985 eV. Es ist zu erkennen, dass die bezüglich ETR1_TMD gesammelten

Daten mit der Kurve der Zusammenfassung der MCA (blaue Kurve) nahezu übereinstimmen. Die MCA-Kurve kann in drei Modellsysteme für Kupferionen aufgespalten werden. Dabei zeigt eine Cu(II)-O₄-Koordination (hellgraue Kurve) das gleiche Absorptionsmaximum bei 8998 eV wie auch ETR1_TMD. Allerdings ist keine Schulter im Bereich zwischen 8980 eV und 8985 eV zu erkennen. Werden Cu(I)-Ionen über N₂O koordiniert (hellgraue Kurve), zeigt die Kurve eine deutliche Schulter im Bereich von 8980 eV bis 8985 eV. Das in Cu(II)-O₄ deutlich zu erkennende Maximum bei 8998 eV ist hier in abgeflachter Form vorhanden. Im Koordinationsmodell für Cu(I)-S₄ (grüne Kurve) ist ebenfalls eine Schulter im Bereich zwischen 8980 eV und 8985 eV zu erkennen. Das Absorptionsmaximum, das in allen anderen Modellen vorhanden ist, ist hier nicht zu beobachten.

Aus diesen Daten konnten von Dr. George Cutsail mittels Fourier-Transformation der *extended X-Ray Absorption fine structure* (EXAFS) die Abstände zwischen dem Kupferion und den Koordinationspartnern bestimmt werden. Daraus geht für den Abstand der Kupferkoordination über ein Stickstoffatom ein Wert von 1,99 Å hervor. Für einen Abstand zwischen dem Kupferion und einem Schwefelatom wurde ein Wert von 2,28 Å bestimmt.

Zusätzlich zur MCA, wurde das Röntgenabsorptionsspektrum mit dem des Kupferproteins CopB verglichen (Meloni, Zhang et al. 2014). Dieser Vergleich ist in Abbildung 3.13 aufgetragen.

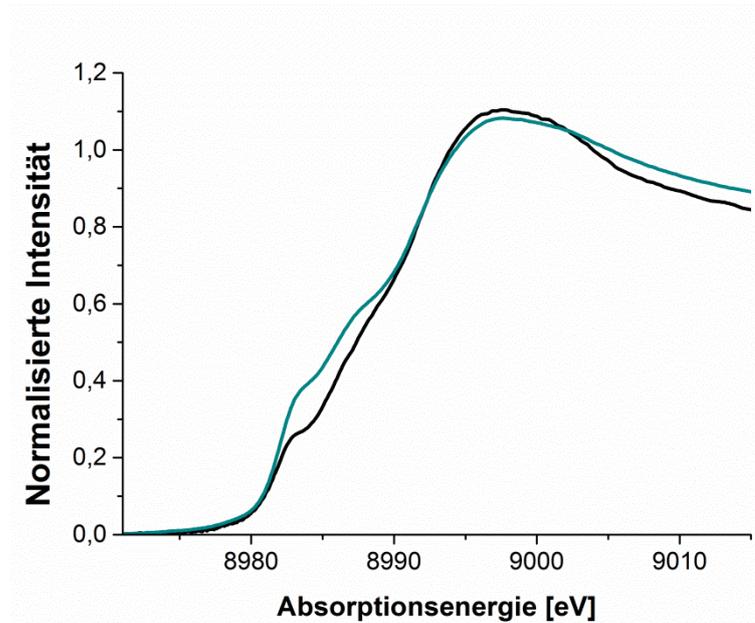


Abb. 3.13: Vergleich der Röntgenabsorptionsspektren von ETR1_TMD und CopB. Die Abbildung zeigt einen Vergleich der Röntgenabsorptionsspektren von ETR1_TMD (schwarze Kurve) und dem kupferbindenden Protein CopB (grüne Kurve). Aufgetragen ist die normalisierte Intensität gegen die Absorptionsenergie in eV.

In Abbildung 3.13 ist zu erkennen, dass die Röntgenabsorptionsspektren von ETR1_TMD und CopB einen ähnlichen Verlauf aufweisen. Genau wie ETR1_TMD zeigt CopB auch ein Maximum bei 8998 eV. Allerdings läuft dieses anders als in ETR1_TMD etwas flacher aus. Darüber hinaus erscheint die Schulter im Bereich zwischen 8980 eV und 8985 eV ausgeprägter und erstreckt sich gleichzeitig bis etwa 8990 eV.

Ein weiterer Vergleich wurde zwischen ETR1_TMD und verschiedenen Stellacyaninmutanten, die in der Lage sind sowohl Cu(I) als auch Cu(II) zu binden, gezogen. In den hier zu Vergleichszwecken heran gezogenen Daten liegt Cu(I) bzw. Cu(II) zu 100% im jeweiligen Redoxzustand vor (DeBeer George, Basumallick et al. 2003). Die unterschiedlichen Mutanten wurden ebenfalls zusammen mit ETR1_TMD in Abbildung 3.14 dargestellt.

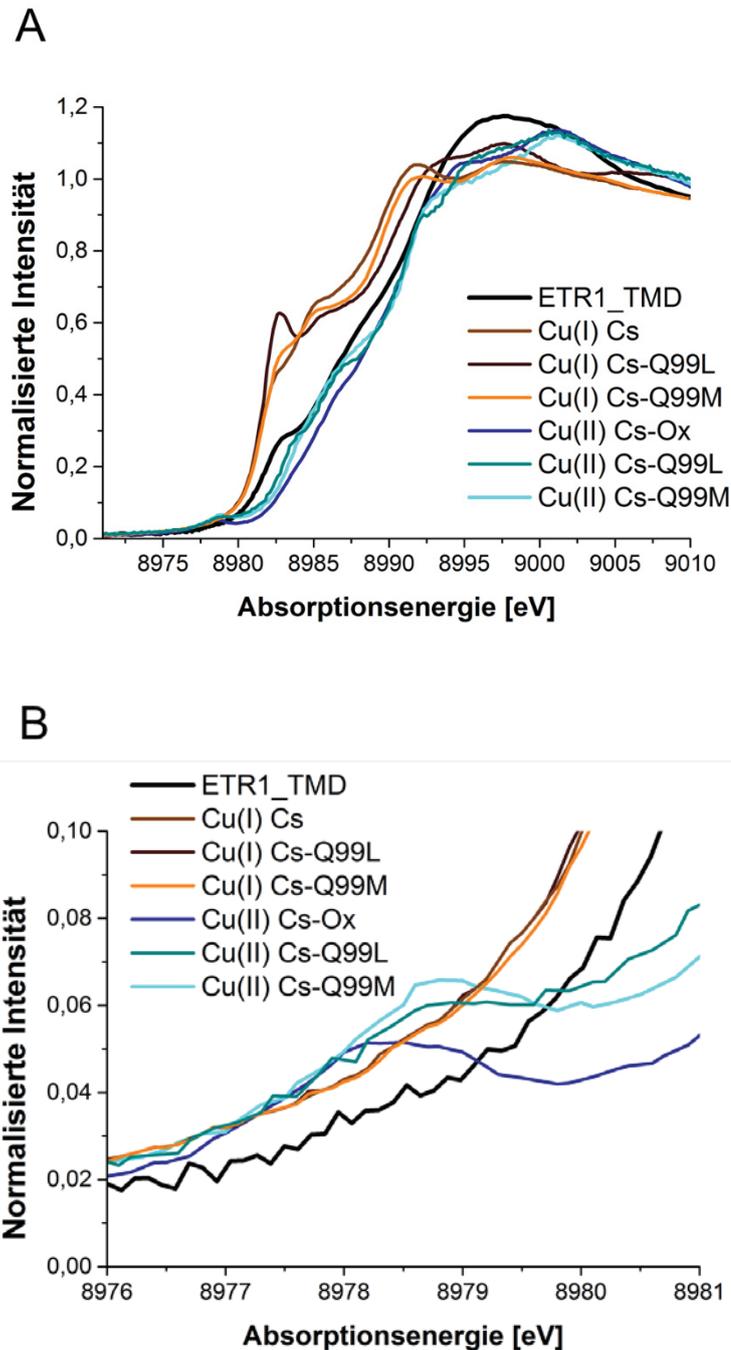


Abb. 3.14: Vergleich der Röntgenabsorptionsspektren von ETR1_TMD und verschiedenen Stellacyaninmutanten. In der Abbildung ist ein Vergleich zwischen den Röntgenabsorptionsspektren von ETR1_TMD und verschiedenen Stellacyaninmutanten dargestellt. Aufgetragen ist die normalisierte Intensität gegen die Absorptionsenergie in eV. In Teilabbildung **A** ist das gesamte Spektrum von 8971 eV bis 9010 eV dargestellt, während Teilabbildung **B** einen Ausschnitt aus A zwischen 8976 eV bis 8981 eV zeigt.

In Abbildung 3.14 ist zu sehen, dass sich, je nachdem welcher Redoxzustand des Kupfers an die Stellacyaninmutanten gebunden wurde, ein anderer Kurvenverlauf ergibt. Dabei zeigen die Proteinvarianten, die nur Kupfer(II)-

Ionen gebunden haben eine Schulter im Bereich bei 8987 eV. Haben die Proteinvarianten von Stellacyanin nur Kupfer(I)-Ionen gebunden, ist eine Schulter bei 8983 eV vorhanden. Im Falle der Cs-Q99L-Mutante ist an dieser Stelle sogar ein Absorptionsmaximum zu erkennen. ETR1_TMD weist im Bereich zwischen 8980 eV und 8990 eV Merkmale beider Kupfer-Spezies auf. In Teilabbildung B wurde der Bereich zwischen 8976 eV und 8981 eV des Gesamtspektrums genauer betrachtet. Dabei ist zu erkennen, dass der Kurvenverlauf von ETR1_TMD hier Ähnlichkeiten zu denen der Stellacyaninmutanten aufweist, die Kupfer(I)-Ionen gebunden haben. Dabei handelt es sich um einen progressiven Kurvenverlauf. Dieser wird bei den Kupfer(II)-beladenen Stellacyaninmutanten durch einen Abfall der Kurve unterbrochen, bevor auch hier die Kurve anschließend wieder zu steigen beginnt.

3.7 Experimentelle Strukturmodellvalidierung mittels Tryptophan-Scanning-Mutagenese

Zur Validierung des von Stephan Schott-Verdugo und Prof. Holger Gohlke vom Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf als Dimer erstellten ETR1_TMD-Modells wurden verschiedene ETR1^{W7X}-Tryptophan-Mutanten erstellt. Das bedeutet, dass in die tryptophanfreie Variante von ETR1 gezielt an einer bestimmten Position eine Aminosäure zu einem Tryptophan ausgetauscht wurde und nun in jeder zu testenden ETR1-Variante ein Tryptophan an einer definierten Position im Protein vorliegt. Basierend auf Vorhersagen aus dem zu validierenden ETR1_TMD Dimer-Modell wurden verschiedene Tryptophanmutanten heterolog exprimiert, isoliert und mittels CD-Spektroskopie hinsichtlich ihres α -helikalen Strukturanteils analysiert. Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung 3.15 dargestellt.

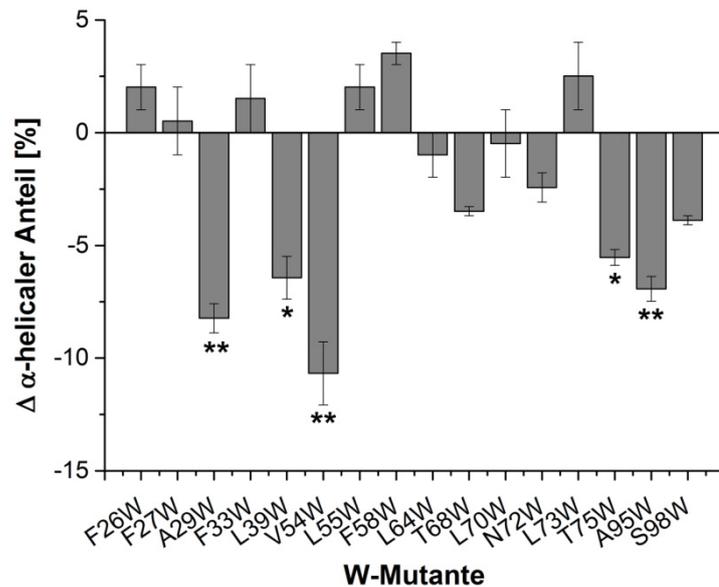


Abb. 3.15: Änderung des α -helikalen Anteils von ETR1_W-Mutanten in Bezug auf ETR1^{W7X} in %. Die Abbildung zeigt die Änderung des α -helikalen Anteils der verwendeten W-Mutanten in %. Als Bezugspunkt dafür diente die tryptophanfreie Variante von ETR1 (ETR1^{W7X}). Die Bestimmung der sekundären Strukturelemente erfolgte mittels CD-Spektroskopie in Dreifachbestimmung. Gezeigt werden die daraus resultierenden Mittelwerte und Standardabweichungen (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,02$).

Die tryptophanfreie Rezeptorvariante ETR1^{W7X}, die als Referenz in diesem Experiment dient, besitzt einen α -helikalen Anteil von 33%. Dieser Wert stimmt mit dem für das wildtypische ETR1 bestimmten α -helikalen Anteil überein. Abbildung 3.15 zeigt, dass einige der Tryptophanmutanten, z. B. F27W (34%), F33W (35%), L64W (32%) und L70W (33%), keine Abweichung von diesem Wert zeigen. Allerdings zeigt der Austausch der Aminosäuren an den Positionen 29, 39, 54, 75 und 95 zu einem Tryptophan eine signifikante Reduktion des α -helikalen Anteils zu 22% bis 27%. Verglichen mit ETR1^{W7X} wurde ein geringerer Anteil in diesem Wert als Indikator für Änderungen in der Proteinstruktur aufgrund der Tryptophaninsertion gewertet. Abbildung 3.16 zeigt die mutierten Aminosäurereste im Kontext des Strukturmodells von ETR1_TMD.

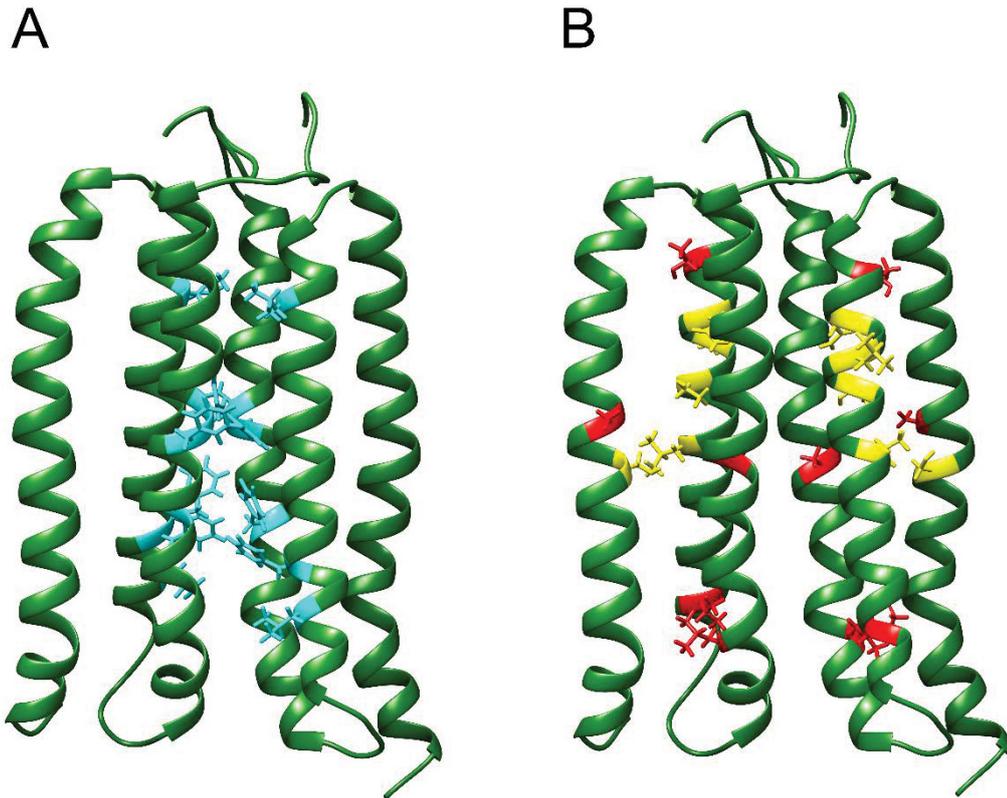


Abb. 3.16: Strukturmodell von ETR1_TMD (Schott-Verdugo, Müller et al. 2019). Die Abbildung zeigt das finale Strukturmodell der Transmembrandomäne von ETR1. In Teilabbildung **A** sind die Aminosäurereste in Blau markiert, die keine Änderung im α -helikalen Anteil bei einem Austausch zu einem Tryptophan zeigen. In Teilabbildung **B** wurden die Aminosäuren in Gelb markiert, deren Austausch zu einem Tryptophan eine partielle Auswirkung auf den α -helikalen Anteil bewirken. In Rot wurden die Aminosäuren markiert, die eine signifikante Reduktion im α -helikalen Anteil aufwiesen, wenn die Position zu einem Tryptophan mutiert wurde.

In Abbildung 3.16 A sind die Aminosäuren in blau hervorgehoben, die keine Reduktion im α -helikalen Anteil zeigen. Diese befinden sich an der Interaktionsfläche der beiden Dimere oder sind in Richtung der Membrenumgebung exponiert. In der Abbildung 3.16 B sind die Aminosäuren markiert, die einen Effekt auf den α -helikalen Anteil zeigen. Rot hervorgehobene Aminosäuren weisen darüber hinaus eine signifikante Reduktion des α -helikalen Anteils auf. Gelb markierte Aminosäuren deuten auf einen partiellen Effekt hin, wenn die entsprechenden Positionen zu einem Tryptophan mutiert werden. Im Allgemeinen deuten sowohl die gelb als auch die rot markierten Aminosäuren im jeweiligen Monomer nach innen in Richtung des Proteinkerns.

4 Diskussion

4.1 Heterologe Expression und Reinigung von ETR1-Rezeptorvarianten

Um *in vitro* Analysen an verschiedenen Rezeptorvarianten von ETR1 durchführen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit die Transmembrandomäne, eine Kupfermutante mit Mutationen an den Positionen C65 und H69 sowie ein Satz von ETR1-Tryptophanmutanten heterolog in *E. coli* exprimiert. Zur Identifizierung der Proteine dienten Anti-His-Antikörper. In allen Fällen konnten die Expression und die Isolation der jeweiligen Rezeptorvariante erfolgreich mittels Westernblot und SDS-PAGE bestätigt werden (vgl. Abb. 3.1 und 3.2). ETR1^{W7X}, das stellvertretend für alle Tryptophanmutanten in Abbildung 3.1 E und F dargestellt ist, besitzt ein aus der Sequenz abgeleitetes, theoretisches Molekulargewicht (MW) von ca. 85 kDa. Sowohl der Westernblot der Expressionsprobe als auch die SDS-PAGE der isolierten Probe zeigen eine Bande knapp oberhalb der 70 kDa Markerbande. Daher ist davon auszugehen, dass es sich bei dem Protein um ETR1^{W7X} handelt. Die zusätzlich auftretende Bande bei ca. 170 kDa (vgl. Abbildung 3.1 F) ist vermutlich auf dimerisierten Rezeptor zurückzuführen (Voet-van-Vormizeele 2006). Die Transmembrandomäne von ETR1 sowie deren Kupfermutante besitzen ein theoretisches MW von ca. 21 kDa. Auch hier ist sowohl in Westernblot als auch SDS-PAGE eine Bande zwischen 15 kDa und 25 kDa zu erkennen (Abbildung 3.1 A-D). Es ist also davon auszugehen, dass es sich bei den exprimierten und isolierten Proteinen um ETR1_TMD bzw. ETR1_TMD-C65S-H69A handelt.

Auch die Expression und Isolation der ETR1_TMD-Variante mit versetztem, C-terminalem Histidin-Tag und dessen Abspaltung mittels Thrombin, konnte erfolgreich gezeigt werden. In Abbildung 3.2 A ist zu sehen, dass ETR1_TMD_Th6xHis in *E. coli* exprimiert wurde. Ebenfalls konnte die Isolation bei ETR1_TMD und ETR1_TMD-C65S-H69A erfolgreich durchgeführt werden (vgl. Abbildung 3.2 B), da sowohl SDS-PAGE als auch Westernblot eine prominente Bande zwischen 15 kDa und 25 kDa zeigen. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Inkubation des Proteins mit Thrombin, zur Abspaltung des 6xHistidin-Tags führt. Durch fortschreitende

Abspaltung verringert sich das MW von ETR1_TMD_Th6xHis geringfügig, was sich zunächst in einer Doppelbande in der SDS-PAGE (vgl. Abbildung 3.2 B Spur 1) und einer geringeren Intensität als zuvor im Westernblot (vgl. Abbildung 3.2 C Spur 1) widerspiegelt. Die geringere Intensität im Westernblot ist auf den Verlust des Histidin-Tags zurückzuführen. Ist kein Signal mehr im Westernblot vorhanden, so wurde der Histidin-Tag vollständig abgetrennt (vgl. Abbildung 3.2 C Spur 16), da der verwendete Antikörper keine Bindung mehr mit dem Protein eingehen kann. In der SDS-PAGE ist das daran zu erkennen, dass nur noch die Bande des geringeren MW zu erkennen ist (vgl. Abbildung 3.2 B Spur 16).

4.2 Molekulare Charakterisierung der Sensordomäne von ETR1

Nach der heterologen Expression in *E. coli* und der Isolation der Domänen ETR1_TMD und ETR1_TMD-C65S-H69A, wurden diese eingehender auf Faltung und Funktionalität untersucht. Zum einen wurden CD-Spektren aufgezeichnet, um daraus den Sekundärstrukturanteil zu ermitteln. Zum anderen wurde eine Interaktionsstudie zwischen ETR1_TMD-C65S-H69A und dem Kupferchaperon ATX1 mittels MST durchgeführt. Die erhaltenen Daten wurden mit bereits publizierten Daten der Interaktion zwischen ETR1_TMD und ATX1 verglichen.

4.2.1 Analyse der Sekundärstrukturelemente

Mit Hilfe der gemessenen CD-Spektren wurden die sekundären Strukturelemente von ETR1_TMD und der Mutante ETR1_TMD-C65S-H69A genauer untersucht. Dabei fällt zuerst auf, dass ETR1_TMD und ETR1_TMD-C65S-H69A einen sehr ähnlichen Kurvenverlauf zeigen. Mit jeweils einem absoluten Minimum bei 210 nm und einem relativen Minimum bei 222 nm ist dieser Verlauf in beiden Fällen typisch α -helikal (Kelly, Jess et al. 2005). Durch die Verwendung einer Analysesoftware und der darin enthaltenen Algorithmen, wurden die experimentell erhaltenen Spektren mit solchen verglichen, bei denen die Zusammensetzung der sekundären Strukturelemente bekannt ist. Dazu wurden die gemessenen Daten um die eingesetzte Proteinkonzentration und die Anzahl der Aminosäurereste korrigiert und die molare Elliptizität gegen die Wellenlänge aufgetragen

(Corrêa und Ramos 2009). Durch die Auswertung der aufgezeichneten Spektren mit Hilfe der Algorithmen Selcon3 und Continll wird für ETR1_TMD ein α -helikaler Anteil von ca. 74% und für ETR1_TMD-C65S-H69A ein gemittelter α -helikaler Anteil von 67,4% erhalten. Darüber hinaus ist in Abbildung 3.3 zu erkennen, dass die experimentell gemessenen Spektren durch die der Algorithmen sehr gut beschrieben werden, weil diese kaum voneinander abweichen. Da bereits bekannt ist, dass die Transmembrandomänen der Ethylenrezeptoren vorwiegend aus α -Helices bestehen (Hall, Shakeel et al. 2007), ist ein so hoher α -helikaler Anteil nicht verwunderlich. Um aber diesen Wert besser einordnen zu können, wurde das sequenzbasierte Vorhersageprogramm SOPMA ebenfalls hinzugezogen. Dieses Programm sagt für beide Proteine einen α -helikalen Anteil von 68% voraus. Daraus resultiert, dass davon ausgegangen werden kann, dass sowohl ETR1_TMD als auch die Kupfermutante ETR1_TMD-C65S-H69A in korrekter Faltung vorliegen.

4.2.2 Bindungsstudien der Sensordomäne von ETR1 mit ATX1

Die Methode der *Microscale* Thermophorese dient der Bestimmung von z. B. Protein-Protein-Interaktionen und deren Affinität. Dabei wird ausgenutzt, dass sich die Bewegung beispielsweise eines Proteins in einem Temperaturgradienten verändert, sobald ein Ligand damit interagiert. Dies kann aufgrund der Massenzunahme des Komplexes oder aber durch Veränderungen in der Ladung oder der Hydrathülle geschehen (Wienken, Baaske et al. 2010, Jerabek-Willemsen, Wienken et al. 2011).

Im Kontext dieser Arbeit ist die Interaktion von ETR1_TMD mit dem Kupferchaperon wie z. B. ATX1 von besonderer Bedeutung. Abbildung 3.4 (vgl. Kapitel 3.2.2) zeigt, dass ETR1_TMD und ATX1 hochaffin miteinander interagieren ($K_D = 313 \pm 74$ nM). Diese Daten wurden bereits in Hoppen und Müller et al. 2019 veröffentlicht und dienen hier zu Vergleichszwecken. In derselben Publikation konnte darüber hinaus ebenfalls die Interaktion zwischen CCH bzw. Nter-RAN1 und ETR1_TMD gezeigt werden. Diese weisen ähnliche Affinitäten von 526 ± 101 nM bzw. 205 ± 35 nM auf. Es kann also auch für CCH und Nter-RAN1 ein Kupfertransfer zu ETR1_TMD vermutet werden, da eine Interaktion dieser Proteine miteinander eine

wichtige Voraussetzung dafür ist (O'Halloran und Culotta 2000, Rosenzweig 2001). Das mutierte ETR1_TMD-C65S-H69A wurde so auf gleiche Weise einer Interaktionsstudie mit ATX1 unterzogen. Dabei wurde ein K_D von 2137 ± 343 nM ermittelt. Diese Affinität ist um einen Faktor von ca. 7 niedriger, als die der Interaktionsstudie mit wildtypischem Protein. Da die Kupfermutante, wie durch die gemessenen CD-Spektren bestätigt werden konnte, einen wildtypischen Anteil α -Helices besitzt (vgl. Kapitel 4.2.1), liegt die Vermutung nahe, dass die eingebrachten Mutationen an den Positionen 65 und 69 die Interaktion mit ATX1 stören. Daraus würde eine höhere Dissoziationskonstante, also eine schlechtere Affinität hervorgehen. Trotz der geringeren Affinität von ETR1_TMD-C65S-H69A und ATX1, welches hier stellvertretend für die Kupferchaperone im Ethylensignalweg verwendet wurde, ist ein Kupfertransfer allein durch eine weniger affine Wechselwirkung nicht ausgeschlossen.

4.3 Kupferbindung und -stöchiometrie

Bislang bot die Anzahl der Kupfer(I)-Ionen, die an die Transmembrandomäne von ETR1 koordiniert werden, eine Grundlage für Diskussion. Während Bleecker und Esch (1998) von einem Kupferion pro Monomer ausgehen, sprechen Daten von Rodríguez und Esch (1999) für ein Kupferion pro Dimer. In dieser Arbeit wurde zur Klärung dieser Frage eine von beiden erwähnten Veröffentlichungen unabhängige *in vitro*-Methode zur Bestimmung der Kupfer-Protein-Stöchiometrie angewendet. ETR1_TMD wurde dabei mit dem $\text{BCA}_2\text{-Cu(I)}$ -Komplex beladen, da BCA die schwerlöslichen Kupfer(I)-Ionen stabilisiert und zusätzlich dazu eine violette Färbung besitzt, die photometrisch bei 562 nm verfolgt und quantifiziert werden kann (Brenner und Harris 1995, Drees und Lübben 2016). Zunächst wurde die Entfärbung der $\text{BCA}_2\text{-Cu(I)}$ -Lösung beobachtet. Das lässt auf einen Übertrag der Kupfer(I)-Ionen auf den Ethylenrezeptor schließen, wodurch der $\text{BCA}_2\text{-Cu(I)}$ -Komplex seine charakteristische violette Färbung verliert. Dazu muss die Affinität von ETR1_TMD zum Kupferion höher sein, als die von BCA. Da die Affinität zwischen BCA und den Kupfer(I)-Ionen eine Dissoziationskonstante in der Größenordnung von 10^{-14} M bestimmt wurde (Xiao, Brose et al. 2011),

wird also angenommen, dass der K_D -Wert für eine Kupfer(I)-Bindung an ETR1_TMD niedriger sein muss. Nach Beladung der Transmembrandomäne von ETR1 mit Kupfer(I)-Ionen wurde diese chemisch und thermisch denaturiert, die darin enthaltenen Kupferionen mit BCA komplexiert und zuletzt mit Berücksichtigung der Proteinkonzentration quantifiziert (vgl. Kapitel 2.7.2). Dieser Ansatz liefert ein Kupfer/Protein-Verhältnis von $1,08 \pm 0,15$. Das entspricht einer Stöchiometrie von einem Kupferion pro Proteinmonomer (vgl. Kapitel 3.3 Abbildung 3.5). Das Ergebnis aus diesem Ansatz entspricht damit der von Bleecker und Esch (1998) angenommenen Stöchiometrie. Dennoch steht er nicht in direktem Widerspruch mit denen von Rodríguez und Esch (1999) publizierten Daten. In einer Folgepublikation wurde das vermutete stöchiometrische Verhältnis von einem Kupfer(I)-Ion pro ETR1-Dimer, aufgrund nicht vollständig aktiven Rezeptors, revidiert. Somit könnte auch die in der vorausgegangenen Arbeit bestimmten Daten ein Verhältnis von einem Kupfer(I)-Ion pro ETR1-Monomer widerspiegeln (McDaniel und Binder 2012).

Da monovalentes Kupfer reaktive Sauerstoffspezies fördert, muss die Konzentration freien Kupfers in biologischen Systemen so niedrig wie möglich gehalten werden, um toxische Effekte zu verhindern. Dazu ist eine hohe Affinität der kupferbindenden Zielproteine nötig. Die Bestimmung der Bindungsaffinität zwischen ETR1_TMD und Kupfer(I)-Ionen wurde mit Hilfe des $\text{BCA}_2\text{-Cu(I)}$ -Komplexes, das in einer Titrationsreihe mit ETR1_TMD verwendet wurde, bestimmt (vgl. Kapitel 3.3 Abbildung 3.6). In diesem Fall kann der K_D jedoch nicht direkt am Wendepunkt Bindungskurve abgelesen werden, da sich in ihr zwei Bindungsereignisse vereinen. Daher wurde der K_D mit Hilfe der in Kapitel 3.3 dargestellten Gleichungen berechnet. Dazu wurde unter Berücksichtigung der Gleichgewichtskonstanten K_R und der Bildungskonstanten von $\text{BCA}_2\text{-Cu(I)}$ β_2 die Dissoziationskonstante für ETR1_TMD und Kupfer(I)-Ionen bestimmt. Die aus diesen Daten berechnete Dissoziationskonstante von $K_D^{1/2} = 1,3 \times 10^{-15}$ M bestätigt die Fähigkeit von ETR1_TMD Kupfer(I)-Ionen in sehr geringen Konzentrationen und somit mit hoher Affinität zu binden. Der kalkulierte K_D -Wert liegt in einer Größenordnung, wie er für Kupferchaperonen in intakten Zellen beobachtet werden konnte (Yatsunyk und Rosenzweig 2007). Gleichzeitig bestätigt er

die oben angenommene niedrigere Affinität von BCA zu Kupfer(I)-Ionen. Das Protein Lysozym, welches als nicht-kupferbindendes Protein bekannt ist (Wernimont, Yatsunyk et al. 2004), sowie ein Poly-Histidin-Peptid zeigen anders als ETR1_TMD keine Abnahme der Absorption im Titrationsexperiment mit $\text{BCA}_2\text{-Cu(I)}$. Dieses Ergebnis ist hinsichtlich des Poly-Histidin-Peptids von besonderer Bedeutung, da es bestätigt, dass kein monovalentes Kupfer an den 10xHistidin-Tag von ETR1_TMD bindet. Darüber hinaus sagt es, dass keine unspezifische Bindung an nicht-kupferbindende Proteine wie Lysozym möglich ist.

Um das erhaltene stöchiometrische Verhältnis von einem Kupfer(I)-Ion pro ETR1_TMD-Monomer weiterführend zu bestätigen, wurden die Titrationsdaten mit dem Hill-Modell gefittet. Dabei dient der stöchiometrische Koeffizient h als ein Maß für die Kooperativität zwischen Bindungsstellen. In bestimmten Fällen, z. B. wenn alle Ligandenmoleküle gleichzeitig binden, gibt er darüber hinaus die Anzahl der Bindungsplätze an einem Proteinmolekül an (Hill 1913). In diesem Zusammenhang wurde für die Titrationsdaten von ETR1_TMD mit dem $\text{BCA}_2\text{-Cu(I)}$ -Reagenz ein Hill-Koeffizient von $h = 1,07 \pm 0,07$ bestimmt (vgl. Kapitel 3.3). Dieser spricht für eine nicht-kooperative Kupferbindung an die Transmembrandomäne von ETR1 und meint, dass die Affinität von Kupfer an ETR1_TMD unabhängig davon ist, ob bereits oder ob noch keine Kupferionen an ETR1_TMD gebunden sind. In diesem Fall spricht der hier bestimmte Hill-Koeffizient ebenso für ein stöchiometrisches Verhältnis von einem Kupfer(I)-Ion pro ETR1_TMD-Monomer und untermauert damit das experimentell bestimmte stöchiometrische Verhältnis.

Der $\text{BCA}_2\text{-Cu(I)}$ -Komplex zeigt bei Titration mit der Kupfermutante ETR1_TMD-C65S-H69A im direkten Vergleich mit dem wildtypischen ETR1_TMD ebenfalls eine Absorptionsabnahme. Das lässt zunächst auf eine Kupferbindung von ETR1_TMD-C65S-H69A schließen, das aufgrund der eingebrachten Mutationen an den Positionen C65 und H69 nicht mehr in der Lage sein sollte den Kupfer-Kofaktor zu binden (Rodríguez, Esch et al. 1999). Allerdings zeigt auch denaturiertes ETR1_TMD ein ähnliches Verhalten. Erst wenn die erhaltenen Daten von ETR1_TMD und ETR1_TMD-

C65S-H69A um die Daten des denaturierten ETR1_TMD als Hintergrundsignal korrigiert werden, ist für ETR1_TMD-C65S-H69A keine Abnahme der Absorption bei 562 nm mehr zu beobachten, während sich der K_D für ETR1_TMD nicht verändert (vgl. Kapitel 3.3 Abbildung 3.7). Daher wird eine unspezifische Bindung von Kupfer(I)-Ionen an ETR1_TMD-C65S-H69A angenommen. Dennoch steht diese Annahme im Widerspruch zu der Beobachtung, dass Lysozym in keiner Weise Bindung, auch keine unspezifische, von Kupfer(I)-Ionen zeigt. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass lineare und nicht-gefaltete Peptide bzw. Proteine, die in ihrer nativen Form in der Lage sind, einen Kofaktor wie z. B. Kupferionen zu binden, dazu ebenfalls in unstrukturiertem Zustand in der Lage sind. In einigen Fällen ist der Kofaktor sogar für die Induktion der Proteinfaltung notwendig (Pozdnyakova und Wittung-Stafshede 2001, Wittung-Stafshede 2004, Mendola, Magri et al. 2010). Es ist nicht bekannt, zu welchem Zeitpunkt der Proteinsynthese der Kupfer(I)-Kofaktor in die Ethylenrezeptoren integriert wird. Das beobachtete Hintergrundsignal des denaturierten ETR1_TMD könnte also darauf zurück zu führen sein, dass nicht-gefaltetes Rezeptorprotein imitiert wird, wodurch die Bindung von Kupferionen unter physiologischen Bedingungen die Faltung des Proteins in der Membran des ER induzieren würden. Bei dieser Hypothese verbleibt also eine gewisse Affinität der Kupfer(I)-Ionen an ETR1_TMD aufgrund der thermischen, irreversiblen Denaturierung, was die beobachtete Absorptionsabnahme des BCA_2 -Cu(I)-Komplexes bei Titration mit denaturiertem ETR1_TMD erklären würde. Es ist denkbar, dass mittels Harnstoffs oder Guanidiniumhydrochlorids reversibel denaturiertes ETR1_TMD eine stärkere Affinität zu Kupfer(I)-Ionen zeigt oder eine Rückfaltung in Anwesenheit von Kupferionen effektiver verlaufen würde. Unter dieser Annahme kann also davon ausgegangen werden, dass sich ETR1_TMD-C65S-H69A wie das denaturierte ETR1_TMD verhält und keine spezifische Bindung für den Kupfer-Kofaktor besitzt.

4.4 Analyse der Kupferbindung mittels EPR-Spektroskopie

Die Kupferbindung von ETR1_TMD wurde zusätzlich zur Untersuchung der Bindungsaffinität und Stöchiometrie mittels EPR-Spektroskopie analysiert. Die Messungen wurden in Kooperation mit Dr. George Cutsail am Max-Planck-Institut für Chemische Energiekonversion in Mülheim a.d.R durchgeführt.

Dabei konnte gezeigt werden, dass die Beladung von ETR1_TMD mit Kupfer(I)-Ionen unter reduzierenden Bedingungen wie erwartet kein Signal im EPR-Spektrum liefert (vgl. Kapitel 3.4. Abbildung 3.8 A), da Kupfer(I)-Ionen kein ungepaartes Elektron besitzen und daher kein paramagnetisches, sondern ein diamagnetisches Verhalten zeigen. Erst wenn die reduziert vorliegenden Metallionen mittels Phenanthrolin oxidiert werden, kann ein Signal beobachtet werden (vgl. Kapitel 3.4. Abbildung 3.8 C), da die nun als Kupfer(II) vorliegenden Ionen klassischerweise auf das Magnetfeld des EPR-Spektrometers reagieren und so sichtbar werden (Sinha, Sommer et al. 2015). Damit ist bewiesen, dass an das in Abbildung 3.8 A dargestellte ETR1_TMD tatsächlich Kupfer(I)-Ionen gebunden haben und das fehlende Signal im EPR-Spektrum nicht auf unbeladenes ETR1_TMD zurückzuführen ist. Anhand des charakteristischen Profils des EPR-Spektrums in Abbildung 3.8 C kann eine Koordination des Kupferions an Stickstoffmoleküle angenommen werden. Das Profil weist hier auf eine sogenannte *nitrogen hyperfine structure* hin (Wiersema und Windle 1964, Lada, Sanakis et al. 2017). Daher ist davon auszugehen, dass das in Abbildung 3.8 C verwendete Phenanthrolin die in ETR1_TMD enthaltenen Kupfer(I)-Ionen nicht nur oxidiert, sondern auch an seine eigenen Stickstoffatome koordiniert (Gutteridge 1984) und so als Chelator fungiert. Die hohe Affinität von Phenanthrolin für Kupfer(I)-Ionen (ungefähr $K_D = 10^{-16}$ M) bestätigt dessen Fähigkeit Kupfer(I)-Ionen von ETR1_TMD übernehmen zu können (Vaal, Mechant et al. 1991). Mit Hilfe der in Abbildung 3.8 D dargestellten Kalibriergerade konnte eine Kupferkonzentration von ca. 57 μM bestimmt werden. Diese Konzentration ist jedoch geringer als angenommen, da 300 μM Protein verwendet wurden. Das stöchiometrische Verhältnis spricht, wie in Kapitel 3.3 gezeigt wurde, für ein Kupfer(I)-Ion pro Proteinmonomer.

Die nun hier nicht erhaltene äquivalente Menge an Kupfer(II)-Ionen lässt vermuten, dass nicht das gesamte Kupfer durch das Phenanthrolin aus ETR1_TMD herausgelöst wurde. Grund dafür ist vermutlich die Oxidation des Kupfers direkt im EPR-Röhrchen, wie sie aufgrund der einfachen Handhabung durchgeführt wurde. Eine Oxidation außerhalb des Glasröhrchens könnte demnach effektiver ablaufen.

Auch die Beladung von ETR1_TMD mit CuSO_4 , also Kupfer(II)-Ionen, zeigt ein Signal im EPR-Spektrum (Abbildung 3.8 B). Dies ist verwunderlich, da bisher keine Kupfer(II)-Bindung an ETR1_TMD angenommen wurde. Da der Histidin-Tag von ETR1_TMD im Vorfeld des Experiments abgespalten wurde, ist eine Bindung von CuSO_4 daran auszuschließen. Das Profil des EPR-Spektrums zeigt zwar keine ausgeprägte *nitrogen hyperfine structure*, dennoch weist es Merkmale von Stickstoffkoordination auf (Faggi, Gavara et al. 2015). Genauer gesagt scheint eine Koordination von sowohl Stickstoff- als auch Schwefelatomen denkbar (Tamayo, Casabó et al. 2007) Dieser Ansatz könnte dann im Falle einer Kupfer(II)-Bindung ebenfalls für die Positionen C65 und H69 in ETR1_TMD sprechen. Das würde bedeuten, dass sowohl für die Kupfer(I)- als auch die Kupfer(II)-Koordination die gleiche Bindungsstelle vorgesehen wäre. Kupfer(II)-Ionen werden hauptsächlich in einer tetragonalen Umgebung mit vier kürzeren und ein bis zwei längeren Bindungen koordiniert (Conry 2006). In Bezug auf ETR1_TMD müssten noch weitere Aminosäurereste zusätzlich zum C65 und H69 in die Koordination des Ions involviert sein. Dennoch konnte eine Kupfer(II)-Bindung an ETR1_TMD auch durch die Beladung der Rezeptordomäne mit verschiedenen Kupferquellen gezeigt werden (vgl. Kapitel 3.5.1 Abbildung 3.11). ETR1_TMD kann demnach nicht nur mit Kupfer(I)-Quellen, wie z. B. dem $\text{BCA}_2\text{-Cu(I)}$ -Komplex oder beladenem Kupferchaperon, beladen werden, sondern auch mittels Cu(II)SO_4 . Die Kupferbeladung von ETR1_TMD kann damit um ca. 15% gesteigert werden. Dieser Anstieg ist geringer, als der durch den $\text{BCA}_2\text{-Cu(I)}$ -Komplex oder das beladene Kupferchaperon. Aber dennoch spiegelt er sich in der aus dem EPR-Spektrum berechneten Kupfermenge wieder. Bei einer eingesetzten Menge von 300 μM ETR1_TMD binden ca. 55 μM Kupfer(II)-Ionen an das Protein. Das entspricht einem Anstieg der Kupferbeladung um ca. 18%. Dies zeigt,

dass eine Bindung von Kupfer(II)-Ionen an ETR1_TMD möglich ist, jedoch ist die Beladungseffizienz im Vergleich zu Kupfer(I)-Ionen ineffektiver. Ob Kupfer(II)-Ionen an die gleichen Aminosäurereste der Transmembrandomäne von ETR1 koordiniert werden können oder ob es sich dabei möglicherweise um eine unspezifische Bindung handelt, ist unklar und bleibt für weitere Analysen offen. Beispielsweise EPR-Studien mit der Kupfermutante ETR1_TMD-65S-H69A und CuSO_4 als Bindungspartner sollten die Hypothese der gleichen Bindungsstelle für Kupfer(I)- und Kupfer(II)-Ionen klären können.

4.5 Kupfertransferstudien der Kupferchaperonen ATX1 und CCH sowie Nter-RAN1 zu ETR1_TMD

Bisher konnte eine Interaktion der Kupferchaperone des Ethylensignalwegs mit ETR1_TMD gezeigt werden (Hoppen, Müller et al. 2019). Dies ist eine Notwendigkeit für einen Kupfertransfer zwischen den Proteinen. Dass ein Kupfertransfer von Kupferchaperonen zum Ethylenrezeptor stattfindet, konnte im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich gezeigt werden (vgl. Kapitel 3.5 Abbildung 3.9 und 3.10). Wird ETR1_TMD mit kupferbeladenem CCH oder ATX1 inkubiert, so kann die Kupferkonzentration in ETR1_TMD nach erfolgter Trennung beider Proteine auf 60% erhöht werden. Das bedeutet einen signifikanten Anstieg der Kupferkonzentration in ETR1_TMD und einen direkten Transfer der Kupferionen. Dieser Transfer der Kupferionen zu ETR1_TMD ist nur möglich, wenn die Affinität der Chaperone für Kupfer geringer ist, als die von ETR1_TMD. Für das ATX1-Homolog aus *Saccharomyces cerevisiae* konnte bereits ein K_D für Kupferionen in der Größenordnung von ca. 10^{-18} M bestimmt werden (Xiao, Brose et al. 2011), während das humane Homolog Atox1 Kupfer mit einer Dissoziationskonstante von 10^{-10} M bindet (Yatsunyk und Rosenzweig 2007). Es ist also möglich, dass die pflanzlichen Chaperone ATX1 und CCH Kupfer mit einer niedrigeren Affinität als ETR1_TMD ($K_D = 1,3 \times 10^{-15}$ M), aber dennoch in der gleichen Größenordnung wie ihre Homologe, binden, sodass ein Kupfertransfer auf ETR1_TMD möglich ist. Gleichzeitig muss die Affinität für Kupfer höher sein, als die von BCA für Kupfer, da auch die

Kupferchaperone mit dem $\text{BCA}_2\text{-Cu(I)}$ -Komplex ($K_D=10^{-14}$ M) beladen werden können. Dennoch konnte keine vollständige Beladung (100%) von ETR1_TMD erzielt werden. Der Einsatz einer höheren Menge kupferbeladenen Chaperons könnte die spätere Beladung von ETR1_TMD mit Kupfer weiter steigern, wie es bereits durch die Beladung mit $\text{BCA}_2\text{-Cu(I)}$ gezeigt werden konnte (vgl. Kapitel 3.5.1). Jedoch ist ebenfalls anzumerken, dass aufgrund des detergent-solubilisierten ETR1_TMD die Zugänglichkeit der Kupferbindungsstelle für die Chaperone beeinträchtigt sein könnte.

Der mit Kupfer beladene N-Terminus von RAN1 konnte ETR1_TMD zu 35 % beladen. Die metallbindenden Domänen des Homologen Menkes-Proteins, wovon auch zwei im N-Terminus von RAN1 enthalten sind, besitzen laut Literatur eine Dissoziationskonstante für Kupfer(I)-Ionen im Bereich von 10^{-10} M bis 10^{-15} M (Yatsunyk und Rosenzweig 2007, Banci, Bertini et al. 2010). Sollte die Affinität des N-Terminus von RAN1 zu Kupfer niedriger sein, als die von BCA zu Kupfer, wie die angegebenen K_D -Werte für das homologe Menkes-Protein vermuten lassen, könnte die schlechtere Beladung von ETR1_TMD durch Nter-RAN1 in einer nicht ausreichenden Ausgangsbeladung von Nter-RAN1 begründet liegen.

Wurden die Chaperone vor der Inkubation mit ETR1_TMD für einen Kupfertransfer mit dem Inhibitor DC_AC50 inkubiert, so ist in allen drei Fällen kein signifikanter Anstieg der Kupferkonzentration in ETR1_TMD zu erkennen. DC_AC50 inhibiert im homologen, humanen System den Kupfertransfer zwischen Atox1 und ATP7A bzw. ATP7B. Da DC_AC50 ein fluoreszierendes Molekül ist, konnte in FRET-Experimenten eine direkte Interaktion mit Atox1 gezeigt werden. Darüber hinaus kann DC_AC50 gezielt die Zellteilung von Lungenkrebszellen inhibieren, während gesunden Zellen davon nicht beeinträchtigt werden (Wang, Luo et al. 2015). Für Atox1 konnte durch Modellierungsexperimente gezeigt werden, dass DC_AC50 nicht an den kupferkoordinierenden Cysteinresten an das Chaperon bindet, sondern an dessen Interaktionsfläche mit dem Zielprotein. Es wird daher davon ausgegangen, dass der Kupfertransfer zum Zielprotein inhibiert wird, da die Wechselwirkung zwischen beiden Proteinen gestört wird (Wang, Luo et al. 2015). Aufgrund der Homologie zwischen ATX1 bzw. CCH und Atox1 ist

davon auszugehen, dass in pflanzlichen Systemen der Kupfertransfer durch DC_AC50 auf die gleiche Weise inhibiert werden kann.

Die Kupfermutante ETR1_TMD-C65S-H69A zeigt ebenfalls keinen Anstieg der Kupferkonzentration, wenn sie mit den kupferbeladenen Chaperonen CCH oder ATX1 inkubiert wurde. Das bedeutet, dass die Mutante, wie schon in anderen Studien (Rodríguez, Esch et al. 1999) sowie in Kapitel 3.3 und 4.3 gezeigt werden konnte, nicht mehr in der Lage ist, Kupfer(I)-Ionen zu binden. Das untermauert die Annahme aus 4.3, dass auch dort bereits keine Bindung des Kupferions an ETR1_TMD-C65S-H69A stattfindet. Gleichzeitig aber ist auszuschließen, dass der Kupfertransfer zwischen ATX1 bzw. CCH und ETR1_TMD-C65S-H69A aufgrund einer nicht stattfindenden Interaktion der Proteine miteinander zurück zu führen ist. Anders, als es bei der Inhibierung durch DC_AC50 der Fall zu sein scheint, können die Kupferchaperone, wie in Kapitel 3.2.2 und 4.2.2 gezeigt wurde, mit der Kupfermutante von ETR1_TMD interagieren.

Kupfer(I)-Ionen werden in Proteinen hauptsächlich entweder linear über zwei Positionen, dreiseitig planar oder tetraedrisch koordiniert (Conry 2006). Bisher ist nicht klar, in welcher dieser Formen das Kupfer(I)-Ion in der Transmembrandomäne von ETR1 koordiniert wird. Allerdings bleibt bei einer Mutation der Positionen C65 und H69 nicht nur der Kupfertransfer aus, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Wie von Rodríguez und Esch (1999) bereits gezeigt werden konnte und in dieser Arbeit methodisch unabhängig bestätigt wurde, bleibt auch eine direkte Kupferbindung aus. Das lässt zunächst auf eine planare Koordination des Kupfer(I)-Ions über die Aminosäuren C65 und H69 schließen. Da allerdings bereits die Mutation der Aminosäure C65 zu Serin oder Tyrosin ausreicht, um eine Kupferbindung zu verhindern (Schaller und Bleecker 1995, Rodríguez, Esch et al. 1999), ist es schwierig daraus abzuleiten, wie viele Aminosäuren insgesamt an der Koordination des Kupfer(I)-Kofaktors beteiligt sind. Daher ist nicht auszuschließen, dass zusätzlich zu den Aminosäuren C65 und H69 für die Koordination des Kupferions in ETR1 bis zu zwei weitere Aminosäurereste notwendig sind.

4.6 Analyse der Kupferkoordinationschemie in ETR1_TMD mittels Röntgenabsorptionsspektroskopie (XAS)

Um Näheres über die Kupferkoordinationschemie innerhalb der Transmembrandomäne von ETR1 zu erfahren, wurden in Kooperation mit Dr. George Cutsail vom Max-Planck-Institut für Chemische Energiekonversion in Mülheim a.d.R XAS-Studien am SSRL durchgeführt.

Die multiple Komponentenanalyse (MCA), der das gemessene Absorptionsspektrum unterzogen wurde (Kapitel 3.6 Abbildung 3.12), zeigt, dass in ETR1_TMD neben Kupfer(I)-Ionen auch Kupfer(II)-Ionen koordiniert vorliegen, da die Kurve Merkmale von sowohl Kupfer(I)- als auch Kupfer(II)-Modellsystemen besitzt. Dieses Ergebnis deckt sich mit den in Kapitel 3.4 und Kapitel 3.5.1 erhaltenen und in Kapitel 4.4 diskutierten Daten, dass ETR1_TMD ebenfalls in der Lage ist Kupfer(II)-Ionen zu binden. Des Weiteren wurde das Spektrum von ETR1_TMD mit Modellsystemen verglichen, die Kupfer(I)-Ionen über Schwefel- bzw. Stickstoffatome koordinieren. Da der Kurvenverlauf von ETR1_TMD auch hier Merkmale beider Modellsysteme aufweist, scheint eine Koordination des Kupfer(I)-Ions an ETR1_TMD über schwefel- bzw. stickstoffhaltige Aminosäureseitenketten wahrscheinlich. Dafür kommen Aminosäuren wie z. B. Cystein, Methionin oder Histidin in Frage. Darüber hinaus konnten die Abstände zum Koordinationspartner bestimmt werden. Ein Stickstoffatom mit einem Abstand von 1,99 Å zum Kupferion konnte als Koordinationspartner identifiziert werden. Dieser Abstand liegt jedoch über dem typischen, erwarteten Wert von 1,95 Å bei einer Kupfer(II)-Koordination und unter einem typischen, erwarteten Wert von 2,05 Å für eine Kupfer(I)-Koordination (Shepard, Anderson et al. 1990, Solomon, Heppner et al. 2014). Das bestätigt die Vermutung der Fähigkeit von ETR1_TMD sowohl Kupfer(I)- als auch Kupfer(II)-Ionen koordinieren zu können durch eine weitere, unabhängige Methode. Der Abstand des zweiten identifizierten Koordinationspartners zum Kupferion liegt bei 2,28 Å und spricht für eine Schwefel-Koordination. Allerdings kann in diesem Fall keine Aussage über die koordinierende Aminosäure getroffen werden, da der berechnete Abstand für eine Kupfer-Cystein-Koordination zu lang und für eine Kupfer-Methionin-

Koordination zu kurz ist (Penfield, Gay et al. 1981, Solomon, Heppner et al. 2014).

Darüber hinaus wurde das Röntgenabsorptionsspektrum von ETR1_TMD mit dem von CopB aus *Archaeoglobus fulgidus* verglichen (vgl. Kapitel 3.6 Abbildung 3.13). Dabei handelt es sich um eine kupferbindende P-Typ ATPase. In der Literatur sind verschiedene Analysen und Schlussfolgerungen bezüglich der Kupferbindung von CopB zu finden. Dabei gehen einige Studien von einer Kupfer(I)- und andere von einer Kupfer(II)-Koordination auf (Solioz und Odermatt 1995, Meloni, Zhang et al. 2014, Purohit, Ross et al. 2018). In dem hier zu Vergleichszwecken herangezogenen Spektrum von CopB konnten mittels EPR-Studien zu 80% Kupfer(II)-Ionen identifiziert werden, die über fünf Liganden u.a. auch Schwefel- und Stickstoffatome koordiniert werden. Die übrigen 20% liegen in Form von Kupfer(I)-Ionen vor (Meloni, Zhang et al. 2014). Dieser Umstand wird im Röntgenabsorptionsspektrum als Schulter bei ca. 8987 eV deutlich. Diese ist bei ETR1_TMD in weniger ausgeprägter Form vorhanden, sodass von einem geringeren Anteil als 80% gebundener Kupfer(II)-Ionen ausgegangen werden kann. Diese Annahme wird durch die geringere Beladungseffizienz von ETR1_TMD durch Cu(II)SO_4 unterstützt (vgl. Kapitel 3.4, 3.5.1 und 4.4). Dagegen spricht die in ETR1_TMD zu beobachtende Schulter im Röntgenabsorptionsspektrum bei ca. 8983 eV für eine Kupfer(I)-Koordination des Proteins. Ähnliche Analysen des humanen Kupferchaperons HAH1 (andere Bezeichnung für Atox1) wurden bezüglich dieses Motivs als charakteristisch für eine zweifache oder dreifache Koordination des Kupfer(I)-Ions gedeutet (Ralle, Lutsenko et al. 2003). Der hier gezogene Vergleich deutet also nicht nur auf eine Bindung von sowohl Kupfer(I)- als auch Kupfer(II)-Ionen an ETR1_TMD hin, sondern auch auf die Beteiligung von zwei oder drei Aminosäuren an der Kupfer(I)-Koordination.

Gleichzeitig wurde das aufgenommene Röntgenabsorptionsspektrum mit denen verschiedener Stellacyaninmutanten aus *Cucumis sativus* verglichen (vgl. Kapitel 3.6 Abbildung 3.14). Diese Mutanten binden Kupfer(I)- bzw. Kupfer(II)-Ionen ohne Verunreinigung der jeweils anderen Kupfer-Spezies. In Teilabbildung 3.14 A weist der Kurvenverlauf von ETR1_TMD demnach

Merkmale beider Kupfer-Spezies auf. Das spricht auch in diesem Fall für eine Bindung von sowohl Kupfer(I)- als auch Kupfer(II)-Ionen an ETR1_TMD und unterstützt diesbezüglich die im Vergleich zu CopB gezogenen Schlüsse und die erhaltenen Ergebnisse der MCA. Im Bereich von 8976 eV bis 8981 eV weist das Spektrum von ETR1_TMD jedoch größere Ähnlichkeit mit denen der Stellacyaninmutanten auf, die Kupfer(I)-Ionen koordiniert haben (DeBeer George, Basumallick et al. 2003). Das unterstützt die Annahme, dass weniger Kupfer(II)- als Kupfer(I)-Ionen an ETR1_TMD koordiniert wurden.

Die hier vorgestellten Daten sprechen für eine Kupfer(I)-Koordination über ein Stickstoffatom, wie es z. B. bei einem Histidinrest der Fall ist und ein Schwefelatom, wofür ein Cystein- oder ein Methioninrest infrage kommt. Im Zusammenhang mit den anderen in dieser Arbeit vorgestellten Daten bzgl. des Kupfertransfers und der Kupferbindung, spricht das für eine Kupferkoordination mittels C65 und H69, da bei Mutation dieser beiden Positionen sowohl keine Kupferbindung, als auch kein Kupfertransfer mehr stattfindet. Das steht im Einklang mit bisher veröffentlichten Daten (Schaller und Bleecker 1995, Rodríguez, Esch et al. 1999), in denen die Positionen C65 und H69 als wichtig für Kupfer- und Ethylenbindung beschrieben werden und damit direkten Einfluss auf die Aktivität des Rezeptors nehmen.

In Bezug auf die Bindung von Kupfer(II)-Ionen an die Transmembrandomäne von ETR1 ist ebenfalls eine Koordination über Stickstoff- und Schwefelatome denkbar. Dafür spricht das erhaltene Ergebnis der EPR-Studien, die gleichermaßen darauf hindeuten (vgl. Kapitel 3.4 und 4.4). Allerdings ist unklar, ob es sich hierbei um die gleiche Bindungsstelle, wie für Kupfer(I)-Ionen handelt. Möglich wäre auch eine zweite Bindungsstelle, wie sie für CopC aus *Pseudomonas syringae* beschrieben wurde. Bei CopC werden Kupfer(II)-Ionen über Stickstoff- und Sauerstoffatome koordiniert, während Kupfer(I)-Ionen über Stickstoff- und Schwefelatome koordiniert werden. Dabei liegen die für den jeweiligen Redoxzustand hoch spezifischen Bindungsstellen für Kupfer ungefähr 30 Å voneinander entfernt (Arnesano, Banci et al. 2003). Es wird angenommen, dass es sich dabei um einen

weiteren Mechanismus in der Kupferhomöostase handelt, der durch die redox-abhängigen Koordinationseigenschaften des Metallions möglich wird.

Unabhängig von der Bindungsstelle der Kupferionen innerhalb der Transmembrandomäne von ETR1 öffnet das Potenzial des Rezeptors, sowohl Kupfer(I)- als auch Kupfer(II)-Ionen koordinieren zu können, ein weites Feld regulatorischer Möglichkeiten. Wie Kupfer(I)-Ionen zum Ethylenrezeptor transportiert werden, ist weitestgehend aufgeklärt. Allerdings bleibt der Abtransport der Metallionen z. B. bei Degradation des Proteins völlig offen.

4.7 Experimentelle Strukturmodellvalidierung mittels Tryptophan-Scanning-Mutagenese

Hochauflösende Strukturinformationen der Ethylenrezeptoren in Form von z. B. Kristallstrukturen sind bislang nur von löslichen Domänen verfügbar (Mayerhofer, Panneerselvam et al. 2015). Dennoch ist die Strukturaufklärung der transmembranen Domäne nicht nur von wissenschaftlichem Interesse. Da die Transmembrandomäne Dreh- und Angelpunkt der Ethylenwahrnehmung ist, bietet sie auch agrarökonomisch in Bezug auf Ethylen- und Kupferbindung ein enormes Potential z. B. hinsichtlich der Verzögerung von Fruchtreifung oder Seneszenz. Jedoch konnte dieser Teil der Ethylenrezeptoren bisher strukturell nicht aufgeklärt werden. In Kooperation mit Prof. Holger Gohlke und Stephan Schott-Verdugo aus dem Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf wurde daher das erste Strukturmodell der Transmembrandomäne des Ethylenrezeptors ETR1 erstellt (Schott-Verdugo, Müller et al. 2019). Da dazu keinerlei homologe Proteine bekannt sind, die zur Modellgenerierung einbezogen werden konnten, wurden *ab initio* Strukturvorhersagen mit koevolutionären Informationen kombiniert. Dass dieser Ansatz zum Erfolg führt, konnte bereits anhand des humanen Zinktransporters hZIP4 gezeigt werden, dessen Strukturmodellierung äußerst ähnlich zu einer später gelösten Kristallstruktur ist (Antala, Ovchinnikov et al. 2015, Zhang, Liu et al. 2017). Von besonderer Bedeutung für die Generierung dieses Modells der

Transmembrandomäne von ETR1, war die Bestimmung der Kupferstöchiometrie (vgl. Kapitel 3.3 und 4.3), die mit in die Berechnungen einfließt. Die Auswahl des Modells erfolgte dann unter Einbeziehung in der Literatur bereits vorhandener, experimenteller Daten sowie neu generierter Daten, die zur unabhängigen Validierung des Modells dienen sollen.

Diese unabhängige Validierung des Modells erfolgte mittels Tryptophan-*Scanning*-Mutagenese (vgl. Kapitel 3.7 Abbildung 3.15). In der Vergangenheit wurden Tryptophan-Substitutionen bereits als erfolgreiches Werkzeug zur Analyse der Anordnung von α -Helices in Membranproteinen eingesetzt (Guzmán, Santiago et al. 2003, De Feo, Mootien et al. 2010). Der Austausch der jeweiligen Aminosäure gegen einen vergleichsweise großen Tryptophanrest kann nur an Positionen toleriert werden, die in Richtung der Membran exponiert sind. Nach innen gekehrt, kann ein Tryptophan die Verbindungsfläche zwischen den einzelnen Helices zerstören und so einen geringeren α -helikalen Strukturanteil bedingen.

Im Kontext des Modells ist zu erkennen, dass Tryptophanmutanten, die in den hydrophilen Kern eines Monomers gerichtet sind, den größten Effekt auf den α -helikalen Anteil zeigen (vgl. Kapitel 3.7 Abbildung 3.16 B). Das entspricht genau den Erwartungen. Im Gegensatz dazu zeigen solche Mutanten, die exponiert in Richtung der Membran vorliegen, keinen Effekt (vgl. Kapitel 3.7 Abbildung 3.16 A). Auch das entspricht den Erwartungen (Guzmán, Santiago et al. 2003, De Feo, Mootien et al. 2010). Allerdings zeigen auch Mutationen an der Dimerinteraktionsfläche keinen Effekt. Auf den ersten Blick erscheint diese Tatsache überraschend, aber demnach wirken sich die raumfordernden Tryptophanmutationen an diesen Positionen nur auf die Dimerisierungseffizienz, aber nicht auf den gesamten α -helikalen Anteil aus, der hier betrachtet wird (Antala, Ovchinnikov et al. 2015).

4.7.1 Die Kupferbindung von ETR1 im Kontext des Strukturmodells der Transmembrandomäne

Im Zuge von MD-Simulationen zur Analyse der Ethylenbindung von ETR1_TMD wurden Kupferionen in das Modell integriert. Dabei zeigt sich eine Bindung des Kupferions an C65, eine Interaktion mit H69 und eine gelegentliche Interaktion mit D25 (Schott-Verdugo, Müller et al. 2019). Abbildung 4.1 zeigt eine Übersicht über die Kupferkoordinationsposition C65, H69 und D25 anhand des Strukturmodells von ETR1_TMD.

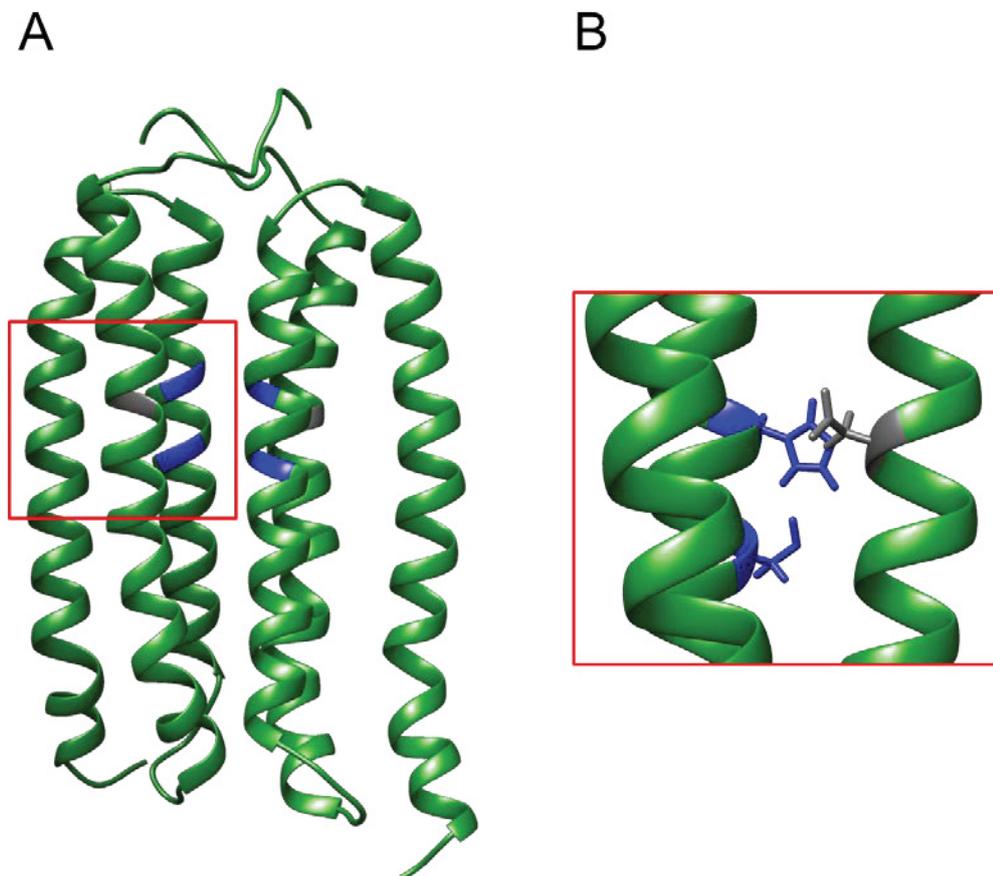


Abbildung 4.1: Die Kupferkoordinationsposition innerhalb der Transmembrandomäne von ETR1. Anhand des Strukturmodells von ETR1_TMD zeigt Abbildungsteil **A** die Aminosäurereste, die in die Koordination des Kupferions involviert sind. Abbildungsteil **B** zeigt einen um 45° gegen den Uhrzeigersinn gedrehten Ausschnitt von A. Darin sind ebenfalls die Seitenketten der koordinierenden Aminosäuren dargestellt. In Blau sind die Aminosäurereste C65 und H69 und in Grau der Aminosäurerest D25 dargestellt.

Die Koordinationszahl des Kupferions an ETR1_TMD pendelt also zwischen zwei und drei direkt an das Protein, während zwei bzw. eine Bindungsstelle durch Wassermoleküle besetzt werden. Demnach wird das Kupferion über vier Positionen koordiniert. Obwohl die Koordinationszahl durch die Verwendung eines nicht-kovalenten Modells möglicherweise beeinflusst wird (Li, Song et al. 2015), wird es in diesem Modell dennoch ähnlich wie in Kupferchaperonen koordiniert (Ansbacher und Shurki 2012). Diese Hinweise passen zu denen in dieser Arbeit erhaltenen Daten bezüglich der Kupfer(I)-Koordination in ETR1_TMD. Außerdem ist anzunehmen, dass der Aspartatrest an Position 25 ein möglicher dritter Kandidat für die Koordination von Kupfer(I)-Ionen ist.

In Bezug auf die Kupfer(II)-Bindung an ETR1_TMD wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Koordination mittels Stickstoff- und Schwefelmolekülen angenommen. Sollte es sich dabei nicht um die Positionen C65 und H69 handeln, so kämen dafür laut Strukturmodell die Positionen C4, C6, D14, H79 und T75 infrage. Diese befinden sich an der dem ER-Lumen zugewandten Seite der ER-Membran und am flexiblen N-Terminus des Proteins. C4 und C6 sind in die Dimerisierung des Proteins involviert und bilden normalerweise Disulfidbrücken mit einem zweiten Monomer aus (Schaller und Bleecker 1995, Schaller, Ladd et al. 1995). Hier wird das Protein in isolierter, detergent-solubilisierter Form verwendet. Sollte das Protein unter diesen Bedingungen keine Disulfidbrücken und somit Dimere bilden, ist eine unspezifische Bindung der Kupfer(II)-Ionen gleichermaßen in Betracht zu ziehen.

4.8 Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit konnte die hohe Spezifität der Transmembrandomäne des Ethylenrezeptors ETR1, Kupfer(I)-Ionen zu binden, anhand eines K_D von $1,3 \times 10^{-15}$ M gezeigt werden. Außerdem wurde die Kupferstöchiometrie auf ein Kupfer(I)-Ion pro Proteinmonomer bestimmt. Diese Daten wurden dazu herangezogen, das erste Strukturmodell der Transmembrandomäne von ETR1 zu erstellen, das mit Hilfe von Typtophan-*Scanning*-Mutagenese in dieser Arbeit erfolgreich validiert werden konnte. Darüber hinaus konnte ein Kupfertransfer von den Chaperonen CCH und ATX1 zu ETR1_TMD gezeigt werden. Dieser findet bei Verwendung der Kupfermutante von ETR1_TMD oder des Inhibitors DC_AC50 nicht statt. Strukturelle Analysen des Rezeptors weisen zudem darauf hin, dass die Kupfer(I)-Koordination über die Reste erfolgt, die bereits in früheren Mutationsstudien als Kupferbindungspartner diskutiert wurden. Dabei handelt es sich um die Positionen C65 und H69.

Zusätzlich zur Bindung von Kupfer(I)-Ionen an ETR1_TMD wurde ebenfalls die Bindung von Kupfer(II)-Ionen festgestellt. Es bleibt herauszufinden, ob die Kupfer(II)-Ionen an die gleiche Bindungsstelle wie Kupfer(I)-Ionen koordiniert werden. Das kann mit Hilfe fortführender röntgenabsorptionsspektroskopischer Analysen erfolgen. Zudem sollte die Kupfermutante von ETR1_TMD auf Kupfer(II)-Bindung untersucht werden. Dafür sind EPR-Messungen eine optimale Methode. Bindet ETR1_TMD-C65S-H69A keine Kupfer(II)-Ionen mehr, ist von derselben Koordinationsposition auszugehen. Unabhängig davon, ob Kupfer(I)- und Kupfer(II)-Ionen durch die gleichen Aminosäurereste koordiniert werden oder ob zwei unterschiedliche Bindungsplätze in der Transmembrandomäne von ETR1 vorhanden sind, ist das daraus resultierende regulatorische Potential enorm. Vor allem aber sollte in fortführenden Studien Ethylen als Ligand einbezogen werden, um im Kontext der Kofaktorbindung eine mögliche Redox-Abhängigkeit des Rezeptors aufzuklären.

Damit in direktem Zusammenhang steht auch der Abtransport der Kupferionen bei einer Degradation des Proteins. Vor allem ist die Frage zu stellen, ob dafür die gleichen Proteine wie für die Anlieferung des

essenziellen Kofaktors verantwortlich sind oder andere und auch, ob dabei der Redoxzustand des Kupferions eine Rolle spielt.

6 Literaturverzeichnis

Abeles, F., et al. (1992). "Ethylene in plant biology." San Diego, CA: Academic Press.

Addicott, F. T. (1957). "Plant Hormones." *Tuatara: Journal of the Biological Society* 6(3).

Ansbacher, T. and Shurki, A. (2012). "Predicting the Coordination Number within Copper Chaperones: Atox1 as Case Study." *The Journal of Physical Chemistry B* 116(15): 4425-4432.

Antala, S., et al. (2015). "Computation and Functional Studies Provide a Model for the Structure of the Zinc Transporter hZIP4." 290(29): 17796-17805.

Arechaga, I., et al. (2000). "Characterisation of new intracellular membranes in *Escherichia coli* accompanying large scale over-production of the b subunit of F1Fo ATP synthase." 482(3): 215-219.

Arnesano, F., et al. (2003). "A redox switch in CopC: an intriguing copper trafficking protein that binds copper(I) and copper(II) at different sites." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(7): 3814-3819.

Arnon, D. I. and Stout, P. R. (1939). "THE ESSENTIALITY OF CERTAIN ELEMENTS IN MINUTE QUANTITY FOR PLANTS WITH SPECIAL REFERENCE TO COPPER." *Plant physiology* 14(2): 371-375.

Banci, L., et al. (2010). "Affinity gradients drive copper to cellular destinations." *Nature* 465(7298): 645-648.

Beauchemin, D. (1999). *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, Methods. Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry.* J. C. Lindon. Oxford, Elsevier: 875-880.

Bell, P. F., et al. (1991). "Determination of the Copper²⁺ Activity Required by Maize Using Chelator-Buffered Nutrient Solutions." *Soil Science Society of America* 55(5): 1366-1374.

- Berleth, M., et al. (2019). "Molecular Analysis of Protein-Protein Interactions in the Ethylene Pathway in the Different Ethylene Receptor Subfamilies." 10(726).
- Beyer, E. M. (1976). "A Potent Inhibitor of Ethylene Action in Plants." 58(3): 268-271.
- Binder, B. M., et al. (2010). "The Copper Transporter RAN1 Is Essential for Biogenesis of Ethylene Receptors in Arabidopsis." 285(48): 37263-37270.
- Bisson, M. M. A. and Groth, G. (2010). "New Insight in Ethylene Signaling: Autokinase Activity of ETR1 Modulates the Interaction of Receptors and EIN2." Molecular Plant 3(5): 882-889.
- Bisson, M. M. A. and Groth, G. (2011). "New paradigm in ethylene signaling: EIN2, the central regulator of the signaling pathway, interacts directly with the upstream receptors." Plant Signaling & Behavior 6(1): 164-166.
- Bleecker, A. B. (1999). "Ethylene perception and signaling: an evolutionary perspective." Trends in Plant Science 4(7): 269-274.
- Brenner, A. J. and Harris, E. D. (1995). "A Quantitative Test for Copper Using Bicinchoninic Acid." Analytical Biochemistry 226(1): 80-84.
- Chang, C., et al. (1993). "Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators." 262(5133): 539-544.
- Chen, Y.-F., et al. (2007). "Ligand-induced Degradation of the Ethylene Receptor ETR2 through a Proteasome-dependent Pathway in Arabidopsis." 282(34): 24752-24758.
- Colman, P. M., et al. (1978). "X-ray crystal structure analysis of plastocyanin at 2.7 Å resolution." Nature 272(5651): 319-324.
- Conry, R. R. (2006). "Copper: Inorganic & Coordination Chemistry (Based in part on the article Copper: Inorganic & Coordination Chemistry by Rebecca R. Conry & Kenneth D. Karlin which appeared in the Encyclopedia of Inorganic Chemistry, First Edition)." Encyclopedia of Inorganic Chemistry.

6 Literaturverzeichnis

Corrêa, D. and Ramos, C. (2009). "The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function." *African Journal of Biochemistry Research* 3: 164-173.

Darwin, C. R. (1880). "Power of Movement in Plants." London: John Murray.

De Feo, C. J., et al. (2010). "Tryptophan scanning analysis of the membrane domain of CTR-copper transporters." *The Journal of membrane biology* 234(2): 113-123.

DeBeer George, S., et al. (2003). "Spectroscopic Investigation of Stellacyanin Mutants: Axial Ligand Interactions at the Blue Copper Site." *Journal of the American Chemical Society* 125(37): 11314-11328.

Drees, S. and Lübben, M. (2016). "Analytical Gel Filtration for Probing Heavy Metal Transfer between Proteins." *BIO-PROTOCOL* 6.

Ducic, T. and Polle, A. (2005). "Transport and detoxification of manganese and copper in plants." *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17: 103-112.

Faggi, E., et al. (2015). "Copper(ii) complexes of macrocyclic and open-chain pseudopeptidic ligands: synthesis, characterization and interaction with dicarboxylates." *Dalton Transactions* 44(28): 12700-12710.

Fernandes, J. C. and Henriques, F. S. (1991). "Biochemical, physiological, and structural effects of excess copper in plants." *The Botanical Review* 57(3): 246-273.

Fernández, B., et al. (2019). *Atomic Absorption Spectrometry | Fundamentals, Instrumentation and Capabilities. Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition)*. P. Worsfold, C. Poole, A. Townshend and M. Miró. Oxford, Academic Press: 137-143.

Follo, C. and Isidoro, C. (2008). "A fast and simple method for simultaneous mixed site-specific mutagenesis of a wide coding sequence." *49(2)*: 175-183.

6 Literaturverzeichnis

- Gamble, R. L., et al. (1998). "Histidine kinase activity of the ETR1 ethylene receptor from *Arabidopsis*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(13): 7825-7829.
- Gao, Z., et al. (2008). "Heteromeric interactions among ethylene receptors mediate signaling in *Arabidopsis*." *The Journal of biological chemistry* 283(35): 23801-23810.
- Geourjon, C. and G. Deléage (1995). "SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments." *Bioinformatics* 11(6): 681-684.
- Gibson, D. G., et al. (2009). "Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases." *Nature Methods* 6: 343.
- Grefen, C., et al. (2008). "Subcellular Localization and In Vivo Interactions of the *Arabidopsis thaliana* Ethylene Receptor Family Members." *Molecular Plant* 1(2): 308-320.
- Gutteridge, J. M. (1984). "Copper-phenanthroline-induced site-specific oxygen-radical damage to DNA. Detection of loosely bound trace copper in biological fluids." *The Biochemical journal* 218(3): 983-985.
- Guzmán, G. R., et al. (2003). "Tryptophan Scanning Mutagenesis in the α M3 Transmembrane Domain of the *Torpedo californica* Acetylcholine Receptor: Functional and Structural Implications." *Biochemistry* 42(42): 12243-12250.
- Guzmán, P. and Ecker, J. R. (1990). "Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants." 2(6): 513-523.
- Hall, B. P., et al. (2007). "Ethylene Receptors: Ethylene Perception and Signal Transduction." 26(2): 118-130.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. (1984). "Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease." *The Biochemical journal* 219(1): 1-14.
- Hazes, B., et al. (1993). "Crystal structure of deoxygenated limulus polyphemus subunit II hemocyanin at 2.18 Å resolution: Clues for a mechanism for allosteric regulation." *Protein Science* 2(4): 597-619.

- Hill, A. V. (1913). "The Combinations of Haemoglobin with Oxygen and with Carbon Monoxide. I." *Biochemical Journal* 7(5): 471-480.
- Himmelblau, E. and Amasino, R. M. (2000). "Delivering copper within plant cells." *Current Opinion in Plant Biology* 3(3): 205-210.
- Hirayama, T., et al. (1999). "RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1, a Menkes/Wilson Disease-Related Copper Transporter, Is Required for Ethylene Signaling in Arabidopsis." *Cell* 97(3): 383-393.
- Holland, P. L. and Tolman, W. B. (1999). "Three-Coordinate Cu(II) Complexes: Structural Models of Trigonal-Planar Type 1 Copper Protein Active Sites." *Journal of the American Chemical Society* 121(31): 7270-7271.
- Hoppen, C., et al. (2019). "The NOP-1 peptide derived from the central regulator of ethylene signaling EIN2 delays floral senescence in cut flowers." *Scientific Reports* 9(1): 1287.
- Hoppen, C., et al. (2019). "Soluble and membrane-bound protein carrier mediate direct copper transport to the ethylene receptor family." *Scientific Reports* 9(1): 10715.
- Houk, R. S., et al. (1980). "Inductively coupled argon plasma as an ion source for mass spectrometric determination of trace elements." *Analytical Chemistry* 52(14): 2283-2289.
- Hua, J., et al. (1995). "Ethylene insensitivity conferred by Arabidopsis ERS gene." *269(5231)*: 1712-1714.
- Hua, J. and Meyerowitz, E. M. (1998). "Ethylene Responses Are Negatively Regulated by a Receptor Gene Family in Arabidopsis thaliana." *Cell* 94(2): 261-271.
- Hua, J., et al. (1998). "EIN4 and ERS2 are members of the putative ethylene receptor gene family in Arabidopsis." *The Plant cell* 10(8): 1321-1332.
- Jerabek-Willemsen, M., et al. (2011). "Molecular interaction studies using microscale thermophoresis." *Assay and drug development technologies* 9(4): 342-353.

Johnson, W. C. (1999). "Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures." *35(3)*: 307-312.

Ju, C., et al. (2012). "CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in Arabidopsis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(47): 19486-19491.

Kelly, S. M., et al. (2005). "How to study proteins by circular dichroism." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1751(2): 119-139.

Kieber, J. J., et al. (1993). "CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in arabidopsis, encodes a member of the Raf family of protein kinases." *Cell* 72(3): 427-441.

Knight, L. I. and Crocker, W. M. (1913). "Toxicity of Smoke." *Botanical Gazette* 55(5): 337-371.

Lada, Z. G., et al. (2017). "Probing the electronic structure of a copper(ii) complex by CW- and pulse-EPR spectroscopy." *Dalton Transactions* 46(26): 8458-8475.

Li, P., et al. (2015). "Systematic Parameterization of Monovalent Ions Employing the Nonbonded Model." *Journal of Chemical Theory and Computation* 11(4): 1645-1657.

Lipman, C. B. and Mackinney, G. (1931). "PROOF OF THE ESSENTIAL NATURE OF COPPER FOR HIGHER GREEN PLANTS." *Plant physiology* 6(3): 593-599.

Magnus, K. A., et al. (1994). "Crystallographic analysis of oxygenated and deoxygenated states of arthropod hemocyanin shows unusual differences." *19(4)*: 302-309.

Mayerhofer, H., et al. (2015). "Structural Model of the Cytosolic Domain of the Plant Ethylene Receptor 1 (ETR1)." *290(5)*: 2644-2658.

- McDaniel, B. K. and Binder, B. M. (2012). "Ethylene receptor 1 (ETR1) is sufficient and has the predominant role in mediating inhibition of ethylene responses by silver in *Arabidopsis thaliana*." *Journal of Biological Chemistry* 287(31): 26094-26103.
- Meloni, G., et al. (2014). "Transmembrane Type-2-like Cu²⁺ Site in the P1B-3-type ATPase CopB: Implications for Metal Selectivity." *ACS Chemical Biology* 9(1): 116-121.
- Mendola, D. L., et al. (2010). "Copper(ii) complex formation with a linear peptide encompassing the putative cell binding site of angiogenin." *Dalton Transactions* 39(44): 10678-10684.
- Merchante, C., et al. (2013). "Ethylene signaling: simple ligand, complex regulation." *Current Opinion in Plant Biology* 16(5): 554-560.
- Milić, D., et al. (2018). "Recognition motif and mechanism of ripening inhibitory peptides in plant hormone receptor ETR1." *Scientific Reports* 8(1): 3890.
- Moussatche, P. and Klee, H. J. (2004). "Autophosphorylation Activity of the *Arabidopsis* Ethylene Receptor Multigene Family." 279(47): 48734-48741.
- Müller-Dieckmann, H.-J., et al. (1999). "The structure of the signal receiver domain of the *Arabidopsis thaliana* ethylene receptor ETR1." *Structure* 7(12): 1547-1556.
- Nar, H., et al. (1991). "Crystal structure analysis of oxidized *Pseudomonas aeruginosa* azurin at pH 5.5 and pH 9.0: A pH-induced conformational transition involves a peptide bond flip." *Journal of Molecular Biology* 221(3): 765-772.
- Neljubow, D. (1901). "Über die horizontale Nutation der Stengel von *Pisum sativum* und einiger anderer Pflanzen." *Pflanzen Beitr Bot Zentralbl* 10: 128-139.
- O'Halloran, T. V. and Culotta, V. C. (2000). "Metallochaperones, an Intracellular Shuttle Service for Metal Ions." 275(33): 25057-25060.

6 Literaturverzeichnis

Penfield, K. W., et al. (1981). "Spectroscopic studies on plastocyanin single crystals: a detailed electronic structure determination of the blue copper active site." *Journal of the American Chemical Society* 103(15): 4382-4388.

Pieterse, C. M. J., et al. (2009). "Networking by small-molecule hormones in plant immunity." *Nature Chemical Biology* 5: 308.

Pozdnyakova, I. and Wittung-Stafshede, P. (2001). "Biological Relevance of Metal Binding before Protein Folding." *Journal of the American Chemical Society* 123(41): 10135-10136.

Printz, B., et al. (2016). "Copper Trafficking in Plants and Its Implication on Cell Wall Dynamics." 7(601).

Provencher, S. W. and Gloeckner, J. (1981). "Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism." *Biochemistry* 20(1): 33-37.

Puig, S., et al. (2007). "Higher plants possess two different types of ATX1-like copper chaperones." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 354(2): 385-390.

Purohit, R., et al. (2018). "Cu⁺-specific CopB transporter: Revising P_{1B}-type ATPase classification." 115(9): 2108-2113.

Qiao, H., et al. (2012). "Processing and subcellular trafficking of ER-tethered EIN2 control response to ethylene gas." *Science (New York, N.Y.)* 338(6105): 390-393.

Ralle, M., et al. (2003). "X-ray Absorption Spectroscopy of the Copper Chaperone HAH1 Reveals a Linear Two-coordinate Cu(I) Center Capable of Adduct Formation with Exogenous Thiols and Phosphines." 278(25): 23163-23170.

Raven, J. A., et al. (1999). "The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O₂-evolving organisms." *Photosynthesis Research* 60(2): 111-150.

- Rial, D. V. and Ceccarelli, E. A. (2002). "Removal of DnaK contamination during fusion protein purifications." *Protein Expression and Purification* 25(3): 503-507.
- Richardson, J., et al. (1975). "Crystal structure of bovine Cu,Zn superoxide dismutase at 3 Å resolution: chain tracing and metal ligands." *J. Mol. Biol.* 72(4): 1349-1353.
- Rodríguez, F. I., et al. (1999). "A Copper Cofactor for the Ethylene Receptor ETR1 from *Arabidopsis*." *Science* 283(5404): 996-998.
- Rosenzweig, A. C. (2001). "Copper Delivery by Metallochaperone Proteins." *Accounts of Chemical Research* 34(2): 119-128.
- Rubino, J. T. and Franz, K. J. (2012). "Coordination chemistry of copper proteins: How nature handles a toxic cargo for essential function." *Journal of Inorganic Biochemistry* 107(1): 129-143.
- Sachs, J. (1880-82). "Über Stoff und Form der Pflanzenorgane." *Arbeiten des Botan. Inst. Würzburg*. Bd. 2. Leipzig.
- Sakai, H., et al. (1998). "ETR2 is an ETR1-like gene involved in ethylene signaling in *Arabidopsis*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(10): 5812-5817.
- Santner, A., et al. (2009). "Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth." *Nature Chemical Biology* 5: 301.
- Santner, A. and Estelle, M. (2009). "Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling." *Nature* 459: 1071.
- Schaller, G. E. and Bleecker, A. B. (1995). "Ethylene-Binding Sites Generated in Yeast Expressing the *Arabidopsis ETR1* Gene." *Plant Cell* 7(12): 1809-1811.
- Schaller, G. E., et al. (1995). "The Ethylene Response Mediator ETR1 from *Arabidopsis* Forms a Disulfide-linked Dimer." *Plant Cell* 7(12): 12526-12530.
- Schott-Verdugo, S., et al. (2019). "Structural Model of the ETR1 Ethylene Receptor Transmembrane Sensor Domain." *Scientific Reports* 9(1): 8869.

- Shakeel, S. N., et al. (2013). "Mechanisms of signal transduction by ethylene: overlapping and non-overlapping signalling roles in a receptor family." *AoB PLANTS* 5: plt010-plt010.
- Shepard, W. E. B., et al. (1990). "Copper coordination geometry in azurin undergoes minimal change on reduction of copper(II) to copper(I)." *Journal of the American Chemical Society* 112(21): 7817-7819.
- Sinha, W., et al. (2015). "Experimentelle und theoretische Untersuchung der Existenz von CuII, CuIII und CuIV in Kupfercorrolen." *127(46)*: 13973-13978.
- Smith, P. K., et al. (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." *Analytical Biochemistry* 150(1): 76-85.
- Solioz, M. and Odermatt, A. (1995). "Copper and Silver Transport by CopB-ATPase in Membrane Vesicles of *Enterococcus hirae*." *270(16)*: 9217-9221.
- Solomon, E. I., et al. (2014). "Copper Active Sites in Biology." *Chemical Reviews* 114(7): 3659-3853.
- Sommer, A. L. (1931). "COPPER AS AN ESSENTIAL FOR PLANT GROWTH." *Plant physiology* 6(2): 339-345.
- Sreerama, N. and Woody, R. W. (2000). "Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set." *Analytical Biochemistry* 287(2): 252-260.
- Tamayo, A., et al. (2007). "Structural and EPR Studies on Single-Crystal and Polycrystalline Samples of Copper(II) and Cobalt(II) Complexes with N2S2-Based Macrocyclic Ligands." *Inorganic Chemistry* 46(14): 5665-5672.
- Vaal, J. M., et al. (1991). "The influence of reducing agent and 1, 10-phenanthroline concentration on DNA cleavage by phenanthroline + copper." *Nucleic Acids Research* 19(12): 3383-3388.
- Valentine, J. S. and Gralla, E. B. (1997). "Delivering Copper Inside Yeast and Human Cells." *278(5339)*: 817-818.

6 Literaturverzeichnis

- Vanstraelen, M. and Benková, E. (2012). "Hormonal Interactions in the Regulation of Plant Development." 28(1): 463-487.
- Voet-van-Vormizeele, J. (2006). "Funktionelle und molekulare Charakterisierung des Ethylenrezeptorproteins ETR1 aus *A. thaliana*." Dissertation an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Voet-van-Vormizeele, J. and Groth, G. (2008). "Ethylene Controls Autophosphorylation of the Histidine Kinase Domain in Ethylene Receptor ETR1." *Molecular Plant* 1(2): 380-387.
- Wang, J., et al. (2015). "Inhibition of human copper trafficking by a small molecule significantly attenuates cancer cell proliferation." *Nature chemistry* 7(12): 968-979.
- Wang, Y. H. and Irving, H. R. (2011). "Developing a model of plant hormone interactions." *Plant Signaling & Behavior* 6(4): 494-500.
- Weckx, J. E. J. and Clijsters, H. M. M. (1996). "Oxidative damage and defense mechanisms in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* as a result of root assimilation of toxic amounts of copper." 96(3): 506-512.
- Wen, X., et al. (2012). "Activation of ethylene signaling is mediated by nuclear translocation of the cleaved EIN2 carboxyl terminus." *Cell research* 22(11): 1613-1616.
- Wernimont, A. K., et al. (2004). "Binding of Copper(I) by the Wilson Disease Protein and Its Copper Chaperone." 279(13): 12269-12276.
- Wienken, C. J., et al. (2010). "Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis." *Nature Communications* 1(1): 100.
- Wiersema, A. K. and Windle, J. J. (1964). "Electron Paramagnetic Resonance of Some Nitrogen-Bonded Copper Chelates¹." *The Journal of Physical Chemistry* 68(8): 2316-2320.
- Williamson, C. E. (1950). "Ethylene, a metabolic product of diseased or injured plants." *Phytopathology* 40(2): 205-208 pp.

6 Literaturverzeichnis

- Wilson, R. L., et al. (2014). "The Ethylene Receptors ETHYLENE RESPONSE1 and ETHYLENE RESPONSE2 Have Contrasting Roles in Seed Germination of Arabidopsis during Salt Stress." 165(3): 1353-1366.
- Wittung-Stafshede, P. (2004). "Role of Cofactors in Folding of the Blue-Copper Protein Azurin." Inorganic Chemistry 43(25): 7926-7933.
- Woeste, K. E. and Kieber, J. J. (2000). "A Strong Loss-of-Function Mutation in *RAN1* Results in Constitutive Activation of the Ethylene Response Pathway as Well as a Rosette-Lethal Phenotype." 12(3): 443-455.
- Xiao, Z., et al. (2011). "Unification of the Copper(I) Binding Affinities of the Metallo-chaperones Atx1, Atox1, and Related Proteins: DETECTION PROBES AND AFFINITY STANDARDS." 286(13): 11047-11055.
- Xiao, Z., et al. (2008). "Transfer of Copper between Bis(thiosemicarbazone) Ligands and Intracellular Copper-Binding Proteins. Insights into Mechanisms of Copper Uptake and Hypoxia Selectivity." Inorganic Chemistry 47(10): 4338-4347.
- Yang, S. and Hoffman, N. (1984). "Ethylene Biosynthesis and its Regulation in Higher Plants." Annual Review of Plant Physiology 35(1): 155-189.
- Yatsunyk, L. A. and Rosenzweig, A. C. (2007). "Cu(I) Binding and Transfer by the N Terminus of the Wilson Disease Protein." 282(12): 8622-8631.
- Zhang, T., et al. (2017). "Crystal structures of a ZIP zinc transporter reveal a binuclear metal center in the transport pathway." 3(8): e1700344.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel
1.1	Pflanzenhormone
1.2	Ethyleninduzierte Seneszenzreaktion bei <i>Rosa sp</i>
1.3	Schematische Übersicht über die Ethylenrezeptoren ETR1 und ETR2
1.4	Mögliche Transportwege des Kupfer(I)-Kofaktors zum Ethylenrezeptor
1.5	Der Ethylensignalweg
1.6	Der BCA_2 -Cu(I)-Komplex
3.1	Heterologe Expression und Isolation von ETR1_TMD, ETR1_TMD-C65S-H69A und ETR1_W-Mutanten
3.2	Expression, Isolation und Inkubation mit Thrombin von ETR1_TMD_Th6xHis
3.3	CD-spektroskopische Analyse von ETR1_TMD und der Mutante ETR1_TMD-C65S-H69A
3.4	Interaktionsstudie zwischen ATX1-Alexa488 und ETR1_TMD-C65S-H69A mittels <i>Microscale</i> Thermophorese im Vergleich zu ETR1_TMD
3.5	Bestimmung der Kupferstöchiometrie von ETR1_TMD
3.6	Untersuchung der Kupferbindung von ETR1_TMD
3.7	Untersuchung der Kupferbindung von ETR1_TMD-C65S-H69A
3.8	Analyse der Kupferbindung von ETR1_TMD mittels EPR-Spektroskopie
3.9	Westernblot (A) und SDS-PAGE (B) der Trennung von Kupferchaperon und ETR1_TMD nach gemeinsamer Inkubation am Beispiel von CCH
3.10	Kupfertransfer von CCH, ATX1 oder Nter-RAN1 zu ETR1_TMD bzw. ETR1_TMD-C65S-H69A
3.11	Kupferbeladung von ETR1_TMD
3.12	Röntgenabsorptionsspektrum von ETR1 und multiple Komponentenanalyse (MCA)

3.13	Vergleich der Röntgenabsorptionsspektren von ETR1_TMD und CopB
3.14	Vergleich der Röntgenabsorptionsspektren von ETR1_TMD und verschiedenen Stellacyaninmutanten
3.15	Änderung des α -helikalen Anteils von ETR1_W-Mutanten in Bezug auf ETR1 ^{W7X} in %
3.16	Strukturmodell von ETR1_TMD
4.1	Die Kupferkoordinationsposition innerhalb der Transmembrandomäne von ETR1
7.1	Westernblot (A) und SDS-PAGE (B) der Trennung von ATX1 und ETR1_TMD nach gemeinsamer Inkubation
7.2	Westernblot (A) und SDS-PAGE (B) der Trennung von Nter-RAN1 und ETR1_TMD nach gemeinsamer Inkubation

7.2 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
A	Ampère
Å	Angström
AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
Abb.	Abbildung
ACC	1-Aminozyklopropan-1-carboxylsäure
AdoMet	5-Adenosyl-Methionin
APS	Aminoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATX1	<i>antioxidant-1</i>
AVG	Aminoethoxyvinylglycin
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
b	Base
BCA	Bicinchoninsäure
bzgl.	bezüglich
°C	Grad Celsius
c	Konzentration

CD	Circular Dicroismus
Cu⁺	Kupfer(I)-Ionen
Cu²⁺	Kupfer(II)-Ionen
CCH	<i>copper transport protein</i>
C-terminal	carboxy-terminal
cm	Zentimeter
CTR1	<i>constitutive triple response 1</i>
Da	Dalton
ddH₂O	Demineralisiertes Wasser, sterilfiltriert und UV-entkeimt durch Milli-Q Wasserfilteranlage
DDM	Dodecylmaltosid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIL	<i>ethylene insensitive 3-like</i>
EIN	<i>ethylene insensitive</i>
EPR	<i>electron paramagnetic resonance</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERS	<i>ethylene response sensor</i>
ETR	<i>ethylene resistant</i>
eV	Absorptionsenergie
EXAFS	<i>extended X-Ray Absorption fine structure</i>
G	Magnetfeld
g	Gramm
h	Stunde
<i>h</i>	Hill-Koeffizient
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer
His	Histidin
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
ICP-MS	<i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
IMAC	immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid

k	Kilo
K_D	Dissoziationskonstante
K_R	Gleichgewichtskonstante
KMB	<i>2-keto-4-methylthiobutyric acid</i>
L	Liter
m	Milli
M	Molarität (mol/L)
MCA	multiple Komponentenanalyse
min	Minute
MST	<i>Microscale Thermophoresis</i>
MTA	<i>5'-methylthioadenosine</i>
MTR	<i>5'-methylthioribose</i>
MTRP	5'-Methylthioribose-1-Phosphat
MW	<i>molecular weight</i> , Molekulargewicht
N-terminal	amino-terminal
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
Nter-RAN1	N-Terminus von RAN1
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
n	nano
nm	Nanometer
OD₆₀₀	bei 600 nm gemessene optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol
pH	pH-Wert
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Raf	<i>rapidly growing fibrosarcoma</i>
RAN1	<i>responsive-to-Antagonist 1</i>
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	<i>size exclusion chromatography</i> ,

Größenausschlusschromatographie	
sec	Sekunde
SV	Säulenvolumen
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TBT	Tris gepufferte Kochsalzlösung mit Tween
TMD	Transmembrandomäne (bei ETR1: AS 1-157)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ü.N.	über Nacht
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	volume per volume
W	Tryptophan
W7X	Tryptophanfrei (in ETR1 wurden die 7 natürlich vorkommenden Tryptophane ausgetauscht)
w/v	<i>weight per volume</i>
X-Ray	Röntgenstrahlung
XAS	Röntgenabsorptionsspektroskopie
xg	Zentrifugalkraft/Beschleunigung
z. B.	zum Beispiel
λ	Wellenlänge
β_2	Formationskonstanten
ϵ	Extinktionskoeffizient
μ	micro
%	Prozent

7.3 Konstrukte und Vektorkarten

7.3.1 Verwendete Plasmid-Konstrukte

Tab. 7.1: Auflistung aller verwendeter Plasmid-Konstrukte, deren Klonierungsstrategie und Verwendungszweck innerhalb dieser Arbeit.

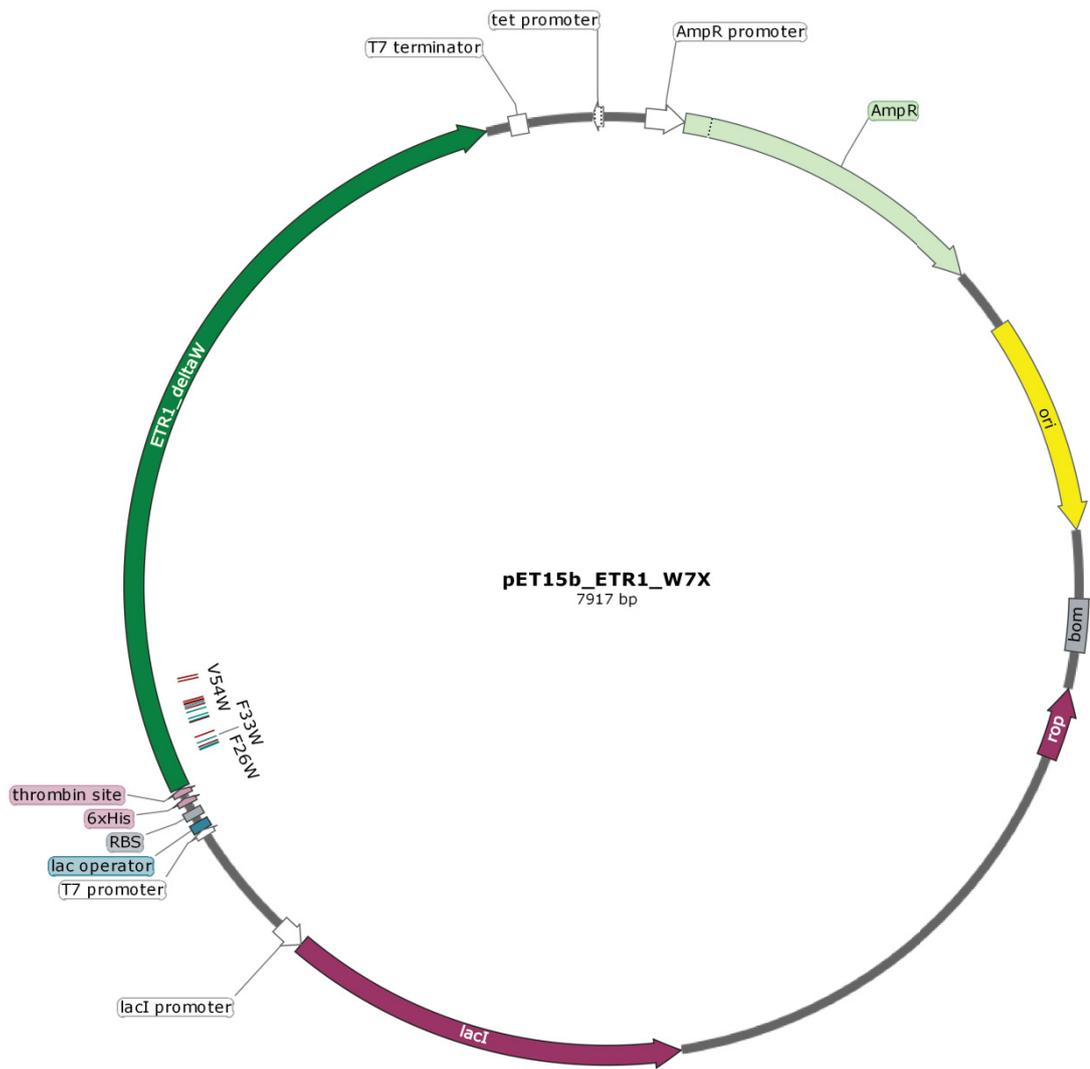
Plasmid-Konstrukt	Klonierungsstrategie	Verwendungszweck
pET16b_ETR1 ¹⁻¹⁵⁷	<i>round the horn</i>	Kupferbindung, -stöchiometrie und -transfer
pET16b_ETR1 ¹⁻¹⁵⁷ _C65S-H69A	<i>round the horn</i>	Kupferbindung, -stöchiometrie und -transfer
pET15b_ETR1 ¹⁻¹⁵⁷ _Th_6xHis	<i>Gibson</i>	Identifizierung Kupferbindungsstelle
pET15b_ETR1 ^{W7X}	lag bereits vor	Kontrolle, Modellvalidierung
pET15b_ETR1 ^{W7X} _F26W	<i>round the horn</i>	Modellvalidierung
pET15b_ETR1 ^{W7X} _F27W	<i>round the horn</i>	Modellvalidierung
pET15b_ETR1 ^{W7X} _A29W	<i>round the horn</i>	Modellvalidierung
pET15b_ETR1 ^{W7X} _F33W	<i>round the horn</i>	Modellvalidierung
pET15b_ETR1 ^{W7X} _L39W	<i>round the horn</i>	Modellvalidierung
pET15b_ETR1 ^{W7X} _V54W	<i>round the horn</i>	Modellvalidierung
pET15b_ETR1 ^{W7X} _L55W	<i>round the horn</i>	Modellvalidierung
pET15b_ETR1 ^{W7X} _F58W	<i>round the horn</i>	Modellvalidierung
pET15b_ETR1 ^{W7X} _F26W	<i>round the horn</i>	Modellvalidierung
pET15b_ETR1 ^{W7X} _L64W	<i>round the horn</i>	Modellvalidierung
pET15b_ETR1 ^{W7X} _T68W	<i>round the horn</i>	Modellvalidierung

pET15b_ETR1^{W7X}_L70W	<i>round the horn</i>	Modellvalidierung
pET15b_ETR1^{W7X}_N72W	<i>round the horn</i>	Modellvalidierung
pET15b_ETR1^{W7X}_L73W	<i>round the horn</i>	Modellvalidierung
pET15b_ETR1^{W7X}_T75W	<i>round the horn</i>	Modellvalidierung
pET15b_ETR1^{W7X}_A95W	<i>round the horn</i>	Modellvalidierung
pET15b_ETR1^{W7X}_S98W	<i>round the horn</i>	Modellvalidierung

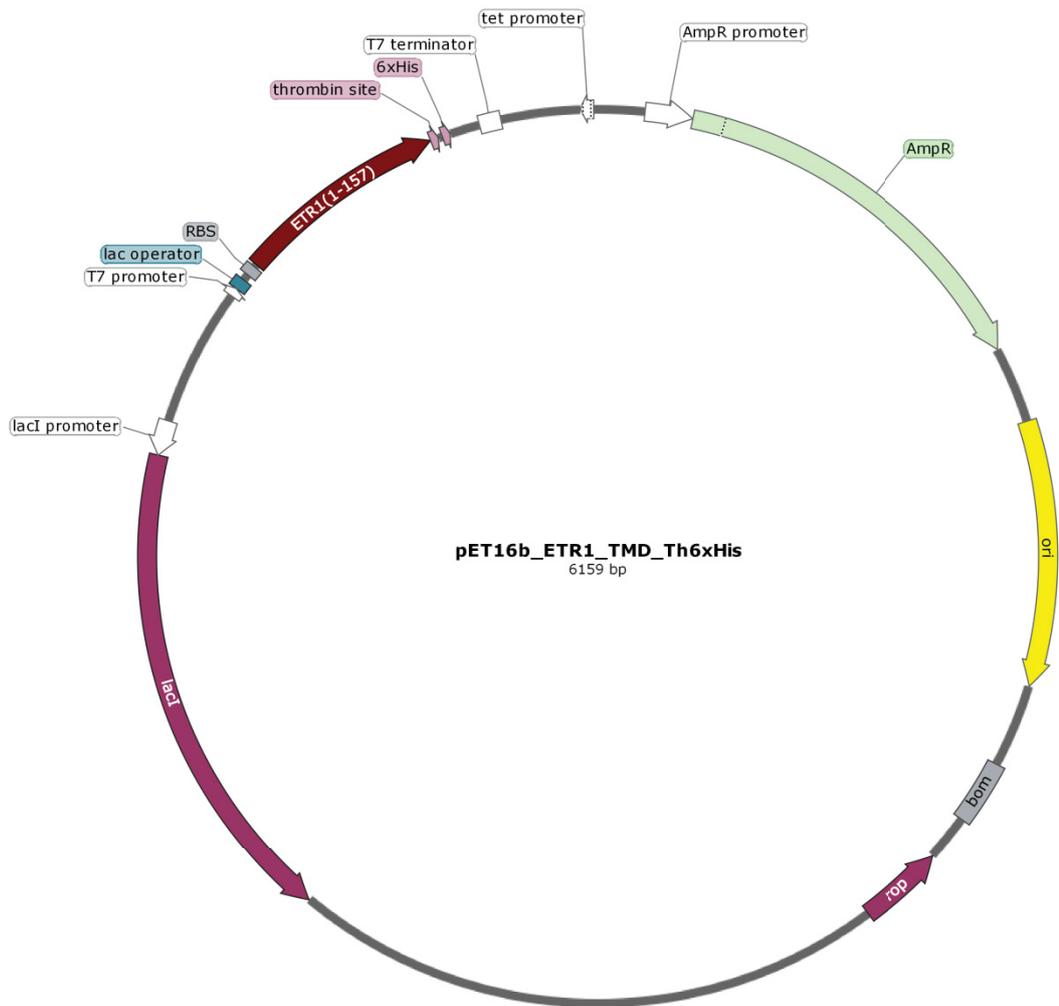
7.3.2 pET16b_ETR1_TMD



7.3.3 pET15b_ETR1_W7X



7.3.4 pET15b_ETR1_TMD_Th6xHis



7.4 Oligonukleotide

Tab. 7.2: Oligonukleotidpaar zur Mutagenese von pET16b_ETR1_TMD aus pET16b_ETR1 mittels *Round the horn site-directed* Mutagenese.

Oligonukleotidpaar	Sequenz
ETR1 ¹⁻¹⁵⁷ _for	TAAGGATCCGGCTGCTAACA
ETR1 ¹⁻¹⁵⁷ _rev	TAAAGTGCTTCTAATCTCATGAGTC

Tab. 7.3: Oligonukleotidpaare zur Klonierung von Einzeltryptophanmutanten in pET15b_ETR1_W7X mittels *Round the horn site-directed* Mutagenese.

Oligonukleotidpaar	Sequenz
A29W_for	ATTGCGTATTTTTCGATTCCCTCTTGAGTTG
A29W_rev	CCAAATGAAGAAATCGGAGATGTATTGGTA
L39W_for	GATTTACTTTGTGAAGAAATCAGCCGTGTT
L39W_rev	CACTCAAGAGGAATCGAAAAATACGCAATC
V54W_for	CTTGTTCAAGTTTGGTGCTTTTATCGTTCTT
V54W_rev	CCAAAATCTATACGGAAACACGGCTGATTT
T68W_for	TGGCATCTTATTA ACTTATTTACTTTCACT
T68W_rev	TGCTCCACAAAGAACGATAAAAGC
N72W_for	TGGTTATTTACTTTCACTACGCATTCTGA
N72W_rev	AATAAGATGAGTTGCTCCACAAAGAACG
T75W_for	ATTA ACTTATTTTGGTTCACTACGCATTCTG
T75W_rev	AAGATGAGTTGCTCCACAAAGAACG
A95W_for	GTTGTCTCGTGTGCTACTGCGTTGAT
A95W_rev	CCAGGTTAACACCTTCGCGGTAGTC

S98W_for	GTGTGCTACTGCGTTGATGCTTGTT
S98W_rev	CAGACAACAGCGGTTAACACCTTC

Tab. 7.4: Oligonukleotidpaare zur Klonierung von pET15b_ETR1_TMD_Th6xHis aus pET15b_ETR1 mittels Gibson Assembly.

Oligonukleotidpaar	Sequenz
Insert_for	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGGAAGTCTGCAA TTGTATTGAAC
Insert_rev	TTAGTGATGATGATGATGATGGCTGCTGCCGCTG CCGCGCGGCACCAGCATGCCCTCGTACAGTCAA AG
Vektor_for	CTGGTGCCGCGCGGCAGCGGCAGCAGCCATCA TCATCATCATCACtTAAGGATCCGGCTGCTAACA
Vektor_rev	ATTGCAGACTTCCATGGTATATCTCCTTCTTAAAG TTAAACAA
pET15b_ETR1 ¹⁻ ¹⁵⁷ _Th6xHis_for	ATGGAAGTCTGCAATTGTATTGA
pET15b_ETR1 ¹⁻ ¹⁵⁷ _Th6xHis_rev	GGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACA

7.5 Aminosäuresequenz von ETR1

```

      10      20      30      40      50      60
MEVCNCIEPQ WPADELLMKY QYISDFFIAS AYFSIPLELI YFVKKSAVEP YRWVLVQFGA

      70      80      90      100     110     120
FIVLCGATHL INLWTFTTHS RTVALVMTTA KVLTAASVVSCA TALMLVHIIP DLLSVKTREL

     130     140     150     160     170     180
FLKNKAAELD REMGLIRTQE ETGRHVRMLT HEIRSTLDRH TILKTTLVEL GRTLALEECA

     190     200     210     220     230     240
LWMPTRTGLE LQLSYTLRHQ HPVEYTVPIQ LPVINQVFGT SRAVKISPNS PVARLRPVSG

     250     260     270     280     290     300
KYMLGEVVAV RVPLHLHSNF QINDWPELST KRYALMVLML PSDSARQWHV HELELVEVVA

     310     320     330     340     350     360
DQVAVALSHA AILEESMRAR DLLMEQNVAL DLARREAETA IRARNDFLAV MNHEMRTPMH

     370     380     390     400     410     420
AIIALSSLLQ ETELTPEQRL MVETILKSSN LLATLMNDVL DLSRLEDGSL QLELGTFFNLH

     430     440     450     460     470     480
TLFREVLNLI KPIAVVKKLP ITLNLAPDLP EFVVGDEKRL MQIILNIVGN AVKFSKQGSI

     490     500     510     520     530     540
SVTALVTKSD TRAADFFVVP TGSHFYLRVK VKDSGAGINP QDIPKIFTKF AQTQSLATRS

     550     560     570     580     590     600
SGGSGLGASLAI SKRFVNLMEG NIWIESDGLG KGCTAIFDVK LGISERSNES KQSGIPKVPA

     610     620     630     640     650     660
IPRHSNFTGL KVLVMDENGV SRMVTKGLLV HLGCEVTTVS SNEECLRVVS HEHKVVFMDV

     670     680     690     700     710     720
CMPGVENYQI ALRIHEKFTK QRHQRPLLVVA LSGNTDKSTK EKCMSFGLDG VLLKPVSLDN

     730
IRDVLSDLLE PRVLYEGM

```

AS 1-157: ETR1-Transmembrandomäne inklusive Helix-Linker zur GAF-Domäne

W: Tryptophane, die zum Erstellen einer tryptophanfreien Variante von ETR1 ausgetauscht wurden

AS: Aminosäuren, die zum Erstellen von Einfach-Mutanten zu Tryptophan ausgetauscht wurden

C: Cysteine an Position 4 und 6, die für die Dimerisierung verantwortlich sind

AS: putative Kupferbindungsstelle

7.6 Separation von der Proteine nach einem Kupfertransfer

7.6.1 Separation von ATX1 und ETR1_TMD

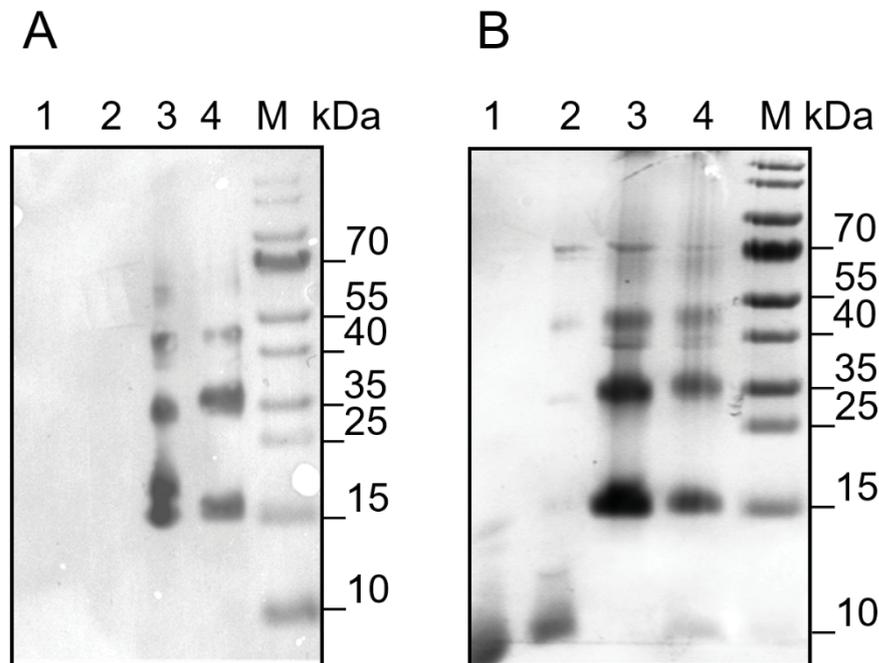


Abb. 7.1: Westernblot (A) und SDS-PAGE (B) der Trennung von ATX1 und ETR1_TMD nach gemeinsamer Inkubation. Die Abbildung zeigt die Trennung von ATX1 und ETR1_TMD, nachdem beide Proteine für einen potenziellen Kupfertransfer gemeinsam inkubiert wurden. Gezeigt sind jeweils sowohl ein Westernblot (A) sowie eine SDS-PAGE (B). In Spur 1 ist ATX1 vor der Inkubation mit ETR1_TMD, aber nach der Abtrennung des Histidin-Tags dargestellt. Spur 2 zeigt das gleiche Protein nach Inkubation mit ETR1_TMD. ETR1_TMD ist ebenfalls vor (Spur 3) und nach (Spur 4) der Inkubation aufgetragen. M gibt den Größenstandard an.

7.6.2 Separation von Nter-RAN1 und ETR1_TMD

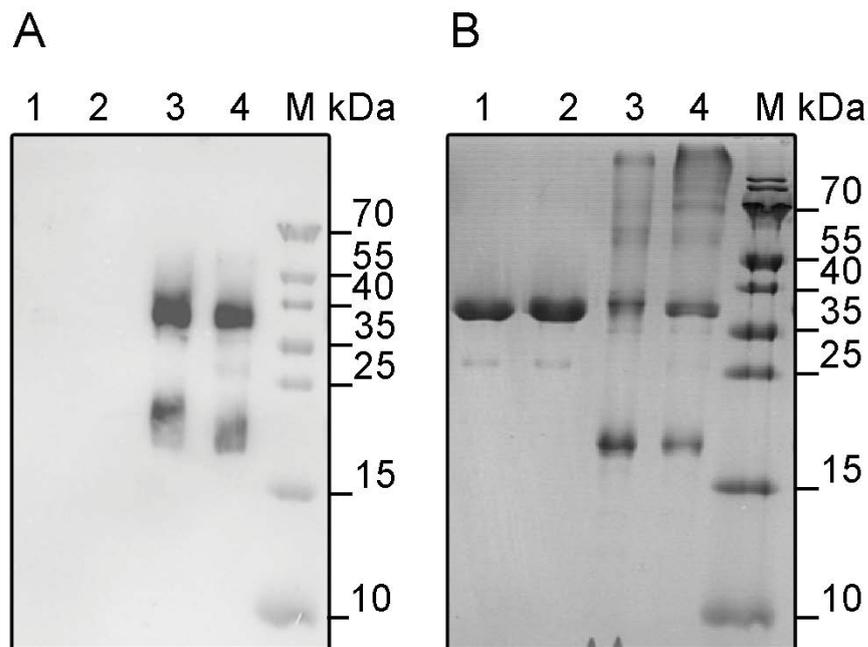


Abb. 6.2: Westernblot (A) und SDS-PAGE (B) der Trennung von Nter-RAN1 und ETR1_TMD nach gemeinsamer Inkubation. Die Abbildung zeigt die Trennung von Nter-RAN1 und ETR1_TMD, nachdem beide Proteine für einen potenziellen Kupfertransfer gemeinsam inkubiert wurden. Gezeigt sind jeweils sowohl ein Westernblot (A) sowie eine SDS-PAGE (B). In Spur 1 ist Nter-RAN1 vor der Inkubation mit ETR1_TMD, aber nach der Abtrennung des Histidin-Tags dargestellt. Spur 2 zeigt das gleiche Protein nach Inkubation mit ETR1_TMD. ETR1_TMD ist ebenfalls vor (Spur 3) und nach (Spur 4) der Inkubation aufgetragen. M gibt den Größenstandard an. Es wurden je 3 μg Protein verwendet.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Groth für die großartige Möglichkeit der Bearbeitung des interessanten Themas bedanken. Gleichzeitig aber auch für die vielen Tipps, Anregungen, das in mich gesetzte Vertrauen während der letzten Jahre und die allzeit offene Tür.

Herrn Prof. Gohlke möchte ich für die Übernahme des Koreferats und die anregenden Diskussionen und die Unterstützung während des Kooperationsprojekts danken.

Dem SFB1208 danke ich für den berühmten Blick über den Tellerrand hinaus. Stellvertretend aber danke ich vor allem Dr. Cordula Kruse und Prof. Lutz Schmitt für die viele Arbeit, die das überhaupt erst möglich gemacht hat.

George, I would like to thank you for all the help you offered me while analysing the ethylene receptor by EPR and XAS.

Liebe Claudia, ich danke dir! Ohne dich wäre die Zeit nicht dieselbe gewesen. Es ist mir eine große Freude gewesen, so viel Zeit mit dir zu verbringen, so eng mit dir zusammen zu arbeiten und dabei in einem Aufwasch eine richtig gute Freundin zu gewinnen!

Nici, es ist kaum in Kaffee zu fassen, wie sehr ich dir für all deine Mühe und deine Hilfe während der letzten Jahre danke. Nicht nur für Laborangelegenheiten, auch für so manches andere Problem hattest du immer ein offenes Ohr und das macht es für mich zu etwas ganz Besonderem.

Kerstin, vielen Dank für all die schönen Momente und die vielen konstruktiven Hinweise, die du nicht nur zu dieser Arbeit, sondern auch bei jedem anderen angefallenen Problem für mich hattest. Du und Nici, ihr seid die guten Seelen des Instituts.

Dominik D., dir danke ich für deine vielen guten Ratschläge, die du während des Verfassens dieser Arbeit für mich hattest.

All ihr anderen lieben Menschen im Institut, vielen Dank für die schöne Zeit mit euch! Es ist mir eine große Ehre ein Teil davon zu sein.

Danksagung

Liebe Mama, lieber Papa, liebe Anja, vielen Dank für eure ständige Unterstützung während der letzten Jahre, aber auch während des gesamten Studiums. Ich bin sehr froh, dass ich euch habe! Ohne euch hätte ich das nicht geschafft.

Thorsten, du bist nicht nur einer der wichtigsten Menschen in meinem Leben, sondern auch der beste Prellbock, den ich mir in den letzten Wochen und Monaten wünschen konnte. Vielen Dank, dass du immer so gelassen bist.

Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Ich habe diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Düsseldorf, November 2019

Lena Müller