



Funktionelle und strukturelle Charakterisierung der Interaktion von Kupferchaperonen mit Ethylenrezeptoren

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von
Claudia Hoppen
aus Köln

Düsseldorf, Dezember 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

Referent: Univ.-Prof. Dr. Georg Groth

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Simon

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhalt

1	Zusammenfassung.....	1
2	Summary	2
3	Einleitung.....	3
3.1	Ethylen in Pflanzen.....	3
3.1.1	Ethylenrezeptoren – Struktur und Funktion.....	4
3.1.2	Der Ethylensignalweg.....	5
3.1.3	Inhibitoren des Ethylensignalweges.....	7
3.1.4	<i>NLS-derived Octapeptide-1</i> (NOP-1)	8
3.2	Kupfer in Pflanzen	9
3.2.1	Lösliche Kupferchelatoren und -chaperone.....	10
3.2.2	Kupfertransportierende P _{1B} -Typ ATPasen	12
3.2.3	Kupferhomöostase in höheren Pflanzen	14
4	Zielsetzung.....	16
5	Ergebnisse.....	18
5.1	NOP-1, ein vom Zentralregulator EIN2 abgeleitetes Peptid, verlängert die Haltbarkeit von Schnittblumen	18
5.2	Lösliche- und membranständige Proteine vermitteln den direkten Kupfertransfer auf Ethylenrezeptoren.....	37
5.3	Funktionelle und Strukturelle Charakterisierung der pflanzlichen Kupferchaperone ATX1 und CCH.	65
6	Diskussion.....	86
6.1	Neuartiger Peptidinhibitor verzögert die Seneszenz von Schnittblumen	87
6.2	Kupfer erreicht die Ethylenrezeptoren auf zwei Wegen	89
6.3	Funktions- und Strukturunterschiede zwischen den pflanzlichen Kupferchaperonen ATX1 und CCH.....	93
7	Literatur.....	96
8	Abkürzungsverzeichnis	102
9	Danksagung.....	104
10	Eidesstattliche Erklärung	105

1 Zusammenfassung

Ethylen ist ein gasförmiges Phytohormon und hauptsächlich bekannt für die Förderung der Fruchtreifung von klimakterischen Früchten wie z. B. Äpfeln, Bananen und Tomaten. Ethylen steuert jedoch auch eine Vielzahl von weiteren Prozessen während des Wachstums von Pflanzen, darunter auch die Seneszenz von Blüten. Die Signalwahrnehmung von Ethylen erfolgt über Ethylenrezeptoren (ETRs), welche am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind und dort u. a. mit dem Zentralregulator EIN2 interagieren. Ein neuartiges Peptid, welches die Kontaktfläche zwischen ETR1 und EIN2 blockiert, stört diese für die Signalweiterleitung essenzielle Interaktion. Das von einer als *Nuclear Localization Signal* (NLS) bezeichneten Sequenz in EIN2 abgeleitete Peptid wird als *NLS-derived Octapeptide 1* (NOP-1) bezeichnet. Es zeigte sowohl bei Tomaten, als auch bei Äpfeln, eine Verzögerung der Fruchtreife nach der Ernte. Durch Studien an Schnittblumen wie Nelken und Rosen sollte überprüft werden, ob NOP-1 ebenfalls die Blütenseneszenz verzögert. In beiden Fällen konnte das Verwelken der Schnittblumen durch Behandlung mit NOP-1 über das Gießwasser um 6-8 Tage hinausgezögert werden.

Ethylenrezeptoren weisen einen Kupfer-Kofaktor auf, welcher essenziell für die Bindung und damit die Wahrnehmung von Ethylen ist. Kupferionen sind redoxaktiv und führen im Milieu des Zytosols zur Entstehung von giftigen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Daher liegt Kupfer niemals frei im Zytosol vor, sondern wird durch spezielle Proteine gebunden. Durch Interaktionsmessungen mit gereinigten Proteinen, sowie bimolekularer Fluoreszenzkomplementation in *N. benthamiana* konnte gezeigt werden, dass Kupfer auf mindestens zwei Wegen zu den ER-ständigen Rezeptoren transportiert wird: Die löslichen Kupferchaperone ATX1 und CCH transportieren Kupferionen zunächst zur ebenfalls ER-ständigen ATPase RAN1. Diese stellt die Kupferionen anschließend den Ethylenrezeptoren zur Verfügung. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die löslichen Chaperone Kupfer auch direkt auf ETR1 übertragen, jedoch mit dem Rezeptor mit einer niedrigeren Affinität interagieren. Die pflanzlichen Kupferchaperone ATX1 und CCH unterscheiden sich durch eine C-terminale Sequenzverlängerung von CCH. CCH transportiert Kupfer von seneszierenden zu neu entstehenden Organen der Pflanze. Alle Kupferchaperone weisen Interaktionen mit Membranstrukturen auf, unterscheiden sich aber in ihrer Lipidbindeeigenschaft. CCH weist nach Kupferbindung eine Dimerisierung auf, welche möglicherweise für den sicheren Langstreckentransport wichtig ist.

2 Summary

Ethylene is a gaseous phytohormone well known for its role in fruit ripening of climacteric fruits such as tomatoes, apples and bananas. However, beside fruit ripening, ethylene is involved in several plant processes. Ethylene effects the growth of plants at nearly all phases of development, and amongst it, flower senescence. Ethylene is perceived by ethylene receptors (ETRs) localized at the endoplasmic reticulum where they directly interact with the central regulator EIN2. A novel peptide, based on the sequence of a *nuclear localization signal* (NLS) of EIN2 was shown to efficiently disturb this interaction. Furthermore, tomatoes and apples treated with this *NLS-derived peptide 1* (NOP-1) post-harvest, exhibited a significant delay in fruit ripening. In this work, studies with carnations and roses were performed to investigate whether NOP-1 also influences senescence of cut flowers. Indeed, carnations and roses treated with NOP-1 in the vase water showed an average delay in senescence of 6 to 8 days.

For ethylene sensing, receptors require a copper cofactor that is essential for the binding of the ligand. Due to their redox potential, copper ions can participate in dangerous Haber/Weiss-Fenton reactions which generate reactive oxygen species (ROS) in the cytosol. To overcome this risk, copper ions never exist in the cytosol in a free state. Instead, they are always bound to specialized proteins that route copper throughout the cell to the final acceptor site, e.g. the ethylene receptors. By combining *in vitro* interaction studies and bimolecular fluorescence complementation in *N. benthamiana* two routes for delivering copper to the receptor have been identified. One way includes the stepwise transport of copper from the soluble copper chaperones ATX1 and CCH to the metal-transporting ATPase RAN1 and finally to ETR1. Based on the affinity constants determined, this is the favoured transport route. Additionally, copper transfer from ATX1 and CCH to the ethylene receptors could be detected, indicating a direct supply of copper by soluble chaperones.

The plant-specific isoform CCH differs from the copper chaperone ATX1 by a C-terminal extension. CCH transports copper from senescing organs of the plant to newly developing parts. In this work, binding studies of ATX1 and CCH unravelled a so far novel function of the C-terminal extension in disturbing lipid interactions of copper chaperones. Furthermore, addition of copper to CCH resulted in a dimerization. Both, altered lipid interaction and dimerization of CCH, may be strategies to ensure efficient long-distance transport of CCH.

3 Einleitung

3.1 Ethylen in Pflanzen

Der Effekt von Ethylen auf Pflanzen wurde bereits 1901 von Dimitry Neljubow beschrieben. Jedoch wurde erst in den 70er Jahren mit der Entdeckung, dass Pflanzen selbst in der Lage sind Ethylen zu synthetisieren, klar, dass es sich um ein gasförmiges Phytohormon handelt (Michener, 1935; Baur und Yang, 1972). Ethylen wird häufig auch Reifegas genannt, da es in klimakterischen Früchten (z. B. Bananen oder Tomaten) nach der Ernte den Reifungsprozess initiiert. Deswegen erfährt Ethylen sowohl agronomisch als auch ökonomisch viel Aufmerksamkeit. Neben der Fruchtreifung spielt das gasförmige Hormon auch eine wesentliche Rolle in weiteren wichtigen Prozessen, darunter Abszission und Seneszenz (Burg und Burg, 1962; Abeles et al., 1992). Ethylen beeinflusst das Wachstum in allen Entwicklungsstadien höherer Pflanzen, beginnend mit der Keimung, dem Wurzelwachstum, der Blüte und der Geschlechtsdetermination (Iqbal et al., 2013). Abgesehen von Entwicklungsprozessen wird Ethylen auch bei biotischem und



Abbildung 1: Ethylen-Dreifach-Antwort am Beispiel von *A. thaliana* Keimlingen. Deutlich erkennbar ist die Verkürzung und Verdickung des Hypokotyls, sowie die Krümmung des Apikalhakens. Modifiziert nach (Chang und Stadler, 2001)

abiotischem Stress von der Pflanze synthetisiert und löst z. B. im Falle von Pathogenbefall die Immunantwort der Pflanzen aus (Chappell et al., 1984; Mauch et al., 1984). Auch bei Trockenheit und Verletzung löst Ethylen eine Antwort auf transkriptioneller Ebene aus. Insgesamt sind mehr als 1000 Genprodukte bekannt, die von Ethylen gesteuert werden (Chang et al., 2013). Dunkelkeimende Samen des Modellorganismus *A. thaliana* zeigen bei Exposition mit dem Phytohormon einen charakteristischen Phänotyp, welcher als Ethylen-Dreifach-Antwort bekannt ist (Neljubow, 1901; Knight et al., 1910). Diese zeichnet sich durch eine Verkürzung und eine daraus resultierende Verdickung des Hypokotyls aus. Außerdem zeigt sich eine charakteristische Krümmung des Apikalhakens (Abbildung 1). Dieser Phänotyp erleichterte die Identifikation von Genprodukten, welche direkt an der Signalwahrnehmung und -weiterleitung beteiligt sind (Guzman und Ecker, 1990).

3.1.1 Ethylenrezeptoren – Struktur und Funktion

Die Entdeckung von Ethylen als Pflanzenhormon führte zur Suche nach dem zugehörigen Rezeptor. Zur Identifikation entsprechender Rezeptorproteine wurden Keimlinge von *A. thaliana* nach Mutanten untersucht, welche bei Exposition mit Ethylen eine vom Wildtyp abweichende Ethylen-Dreifach-Antwort zeigten (Ecker, 1995). In *A. thaliana* konnten auf diese Weise fünf Ethylenrezeptoren identifiziert werden (Abbildung 2).

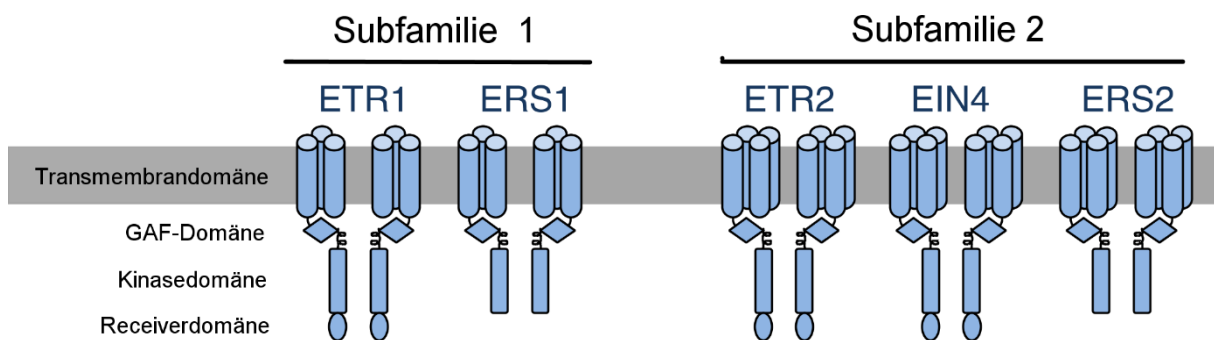


Abbildung 2: Schematische Darstellung der fünf in *A. thaliana* identifizierten Ethylenrezeptoren. Unterschieden werden diese in Subfamilie 1 und 2. Alle Rezeptoren besitzen den gleichen modularen Aufbau. Die Transmembrandomäne beherbergt die Bindestelle für Ethylen und den essenziellen Kupfer-Kofaktor. Subfamilie 1 weist drei, Subfamilie 2 vier Transmembranhelices auf. Es folgt eine cGMP-spezifische Phosphodiesterase, Adenylylzyclase und FhlA (GAF) Domäne, sowie eine Kinasedomäne mit Autophosphorylierungseigenschaften. ETR1, ETR2 und EIN4 verfügen zusätzlich noch über eine Receiverdomäne. Die Rezeptoren liegen in der Membran als Homo- bzw. Heterodimere oder höhermolekulare Oligomere vor. Modifiziert nach (Light et al., 2016).

Ethylenrezeptoren werden in zwei Subfamilien unterschieden. Beide Subtypen haben den gleichen modularen Aufbau bestehend aus einer Transmembrandomäne, einer cGMP-spezifischen Phosphodiesterase, Adenylylzyclase und FhlA (GAF) Domäne, einer Kinasedomäne und in einigen Fällen einer Receiverdomäne (Chang und Stadler, 2001). Mit der am N-Terminus gelegenen Transmembrandomäne werden die Rezeptoren in der Membran verankert. Subfamilie 1 weist drei Transmembranhelices auf, während Subfamilie 2 vier besitzt (Sakai et al., 1998). Die Transmembrandomäne stellt die Bindestelle für das Phytohormon Ethylen dar (Schaller und Bleecker, 1995). Für die Bindung essenziell ist ein, ebenfalls in der Transmembrandomäne gebundener, Kupfer-Kofaktor (Alonso et al., 1999; Hirayama et al., 1999; Hirayama und Alonso, 2000). Der Rezeptor ETR1 (*Ethylene receptor 1*) stellt dabei den wichtigsten Rezeptor in *A. thaliana* dar, da schon der Funktionsverlust dieses Rezeptors zur Insensitivität gegenüber Ethylen führt. Im Juni 2019 wurde das erste Strukturmodell für die Transmembrandomäne von ETR1 mit gebundenem Liganden und Kofaktor veröffentlicht (Schott-Verdugo et al., 2019). Durch Kombination von Molekulardynamik-Simulationen und Validierungsexperimenten konnten Aufbau und Stöchiometrie der Kupfer- und Ethylenbindetasche aufgeklärt werden. Demnach binden zwei Kupfer(I)-Ionen an ein ETR1-Dimer und ermöglichen so das Andocken eines Ethylenmoleküls (Schott-Verdugo

et al., 2019). Durch den Kupfer-Kofaktor erreichen Pflanzen eine hohe Affinität und Spezifität für Ethylen, trotz der simplen chemischen Struktur des Alkens (Burg und Burg, 1962). Ethylenrezeptoren liegen als Homo-/Heterodimere oder als höhermolekulare Komplexe in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und Golgi Apparates vor (Chen et al., 2002; Grefen et al., 2008; Berleth et al., 2019). Die Dimere sind dabei über Disulfidbrücken am N-Terminus kovalent miteinander verknüpft (Schaller et al., 1995). Ethylen ist nicht nur durch sein gasförmiges Auftreten, sondern auch durch seine Hydrophobizität in der Lage frei durch Membranen zu diffundieren. Dies erklärt auch die ungewöhnliche Lokalisation der Rezeptoren im Endomembransystem der Pflanzenzelle.

3.1.2 Der Ethylensignalweg

Ethylenrezeptoren sind Negativregulatoren. Dies bedeutet, dass ihre konstitutive Aktivität die Ethylenantwort reprimiert. Struktur und Sequenz von ETR1 weisen Ähnlichkeiten zum prokaryotischen Zweikomponentensystem, bestehend aus einer Histidinkinase und einem Antwort-Regulator, auf (Chang et al., 1993). Wie auch beim Zweikomponentensystem wird die Übertragung von Phosphorylgruppen zur Aktivierung bzw. Inaktivierung des Signalwegs genutzt. Die drei Hauptkomponenten bilden dabei, neben den Ethylenrezeptoren, die Raf-ähnliche Kinase CTR1 (CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1) und der Zentralregulator EIN2 (*Ethylene-insensitiv protein 2*). CTR1 ist ein lösliches Protein und bildet einen festen Komplex mit Ethylenrezeptoren aus (Clark et al., 1998). Das Membranprotein EIN2 ist ebenso wie die Ethylenrezeptoren am ER lokalisiert und interagiert dort direkt mit CTR1 und den Rezeptoren (Bisson et al., 2009). Der Membranteil von EIN2 weist Homologie zu bivalenten Metalltransportern der NRAMP (*Natural resistance-associated macrophage protein*)-Superfamilie auf, weshalb eine regulatorische Funktion von bivalenten Metallionen diskutiert wird (Thomine et al., 2000). EIN2 verfügt neben dem Membranteil über einen großen, C-terminalen löslichen Bereich (CEND), welcher essenziell für eine funktionelle Signalweiterleitung im Ethylensignalweg ist (Alonso et al., 1999). Zudem weist der CEND von EIN2 eine Vielzahl von Phosphorylierungsstellen auf, welche für die Steuerung der Signalweiterleitung essenziell sind (Ju et al., 2012).

In Abwesenheit von Ethylen wird ETR1 phosphoryliert und aktiviert dadurch CTR1. Dieses wiederum phosphoryliert unter ATP-Verbrauch das CEND von EIN2 (Ju et al., 2012). Die Phosphorylierung des CEND markiert diesen für die Degradation durch das 26S Proteasom, wodurch die Signalweiterleitung unterbunden wird (Abbildung 3, links)

(Ju et al., 2012). Ebenso kommt es zum Abbau der Transkriptionsfaktoren EIN3 (Protein ETHYLENE INSENSITIVE 3) und EIL3 (ETHYLENE INSENSITIVE 3-like 3 protein) (An et al., 2010). Die Markierung zum Abbau erfolgt dabei sowohl für EIN2, als auch EIN3 und EIL3 über die F-Box Proteine ETP1/2 (*EIN2 targeting protein 1/2*) und EBF1/2 (*EIN3 binding F-box 1/2*) (Qiao et al., 2009).

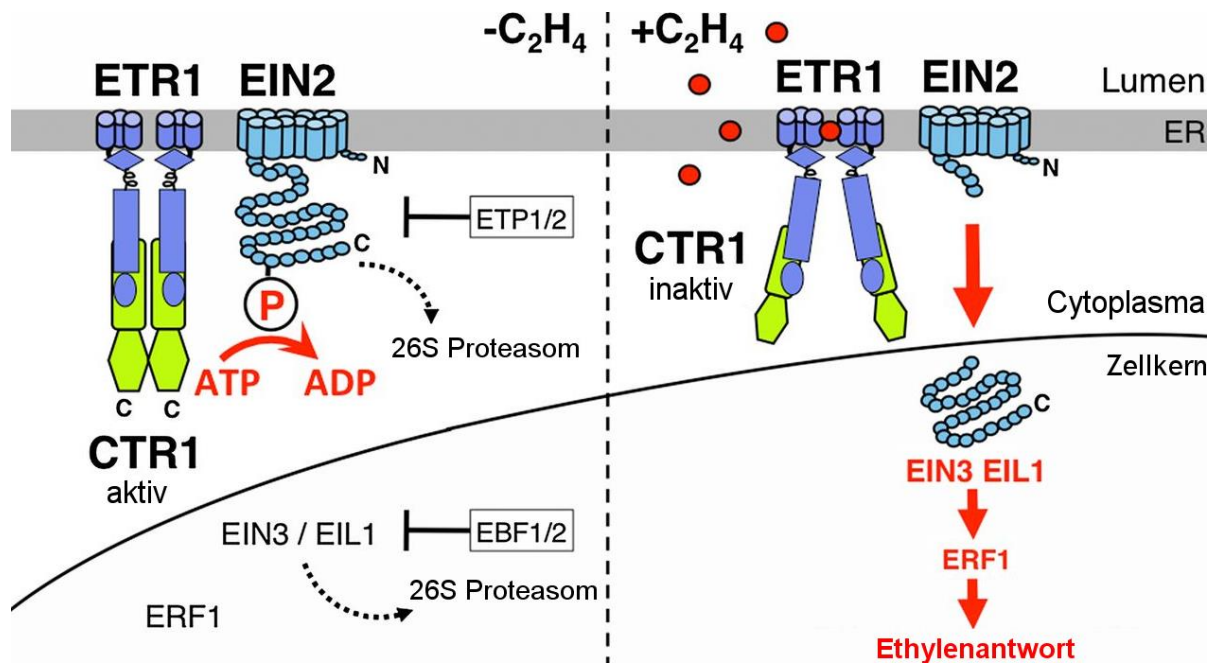


Abbildung 3: Ethylensignalweg in Abwesenheit (links) und Anwesenheit (rechts) von Ethylen (C₂H₄) am Beispiel von ETR1. ETR1 ist konstitutiv aktiv in Abwesenheit des Liganden und aktiviert die Kinase CTR1 durch Phosphorylierung. Diese wiederum überträgt die Phosphorylgruppe auf das CEND von EIN2, dem zentralen Regulator des Ethylensignalweges. Die Phosphorylierung des CEND verhindert eine Relokalisation in den Zellkern. Sowohl EIN2 als auch die Transkriptionsfaktoren EIN3 und EIL3 werden dadurch zum Ziel proteasomalen Abbaus durch F-Box-Proteine (ETP1/2, EBF1/2). In Anwesenheit von Ethylen wird ETR1 inaktiviert, wodurch wiederum CTR1 inaktiviert wird. Durch einen noch unbekannten proteolytischen Mechanismus kommt es zur Abspaltung des CEND und Relokalisation in den Zellkern. Dort stabilisiert das CEND die Transkriptionsfaktoren EIN3 und EIL3 wodurch die Ethylenantwort auf Transkriptionsebene ausgelöst wird. Modifiziert nach (Ju et al., 2012).

In Anwesenheit von Ethylen (C₂H₄) bewirkt dessen Bindung die Inaktivierung des Rezeptors. Dadurch wird auch CTR1 inaktiviert und es findet keine Phosphorylierung von EIN2 mehr statt. Durch eine unbekannte Protease oder einer autoproteolytischen Aktivität von EIN2 kommt es zur Abspaltung des CEND (Abbildung 3, rechts). Dieses wird in den Zellkern relokalisiert und stabilisiert dort die Transkriptionsfaktoren EIN3 und EIL3 (An et al., 2010). EIN3 seinerseits aktiviert die Expression des Transkriptionsfaktors ERF1 (*Ethylene-responsive transcription factor 1*), welcher eine Vielzahl von Genen beeinflusst und letztendlich die Ethylenantwort auslöst (Hao et al., 1998).

3.1.3 Inhibitoren des Ethylensignalweges

Die Entwicklung von Stoffen, welche die Ethylenantwort inhibieren und somit z. B. die Fruchtreifung in klimakterischen Früchten oder die Seneszenz von Zierpflanzen hinauszögern, ist von großem agronomischen Interesse. Diese Inhibitoren können in drei Prozesse des Ethylensignalweges eingreifen: die Biosynthese von Ethylen, die Bindung des Liganden an die Rezeptoren oder die Signalweiterleitung selbst.

Die Biosynthese von Ethylen geschieht ausgehend von S-Adenosylmethionin (SAM). Schlüsselenzyme sind dabei die 1-Aminocyclopropan-1-carboxylat Synthase (ACC Synthase), welche SAM in die direkte Ethylenvorstufe ACC umwandelt, sowie die ACC Oxidase welche dieses sauerstoffabhängig zu Ethylen umwandelt. Das spezielle Züchten von Pflanzen mit verringerter Biosynthese ist insbesondere in der Zierpflanzenindustrie bereits gängige Praxis (Savin et al., 1995). Zudem wurden Inhibitoren gegen das Schlüsselenzym der Biosynthese von Ethylen, die ACC-Synthase, entwickelt. Dazu zählen 1-Aminoethoxyvinylglycin (1-AVG) und Aminooxyessigsäure (AOA), welche beide die Umsetzung von SAM zu ACC effektiv inhibieren können (Broun und Mayak, 1981). Die Inhibierung der Biosynthese birgt den großen Nachteil, dass diese nur gegen die Auswirkungen von endogenem Ethylen schützt und Pflanzen, welche exogen Ethylen ausgesetzt sind, immer noch auf Ethylen reagieren.

Als effektivere Zielstruktur erweisen sich daher die Ethylenrezeptoren, da hierbei der erste Schritt des Signalweges, die Ethylenwahrnehmung, betroffen ist. Als hochaffine nicht-biologisch aktive Ethylenanaloga eignen sich besonders Cyclopropenverbindungen, von denen manche bereits zur Verlängerung der Haltbarkeit sowohl von Obst als auch Schnittblumen eingesetzt werden (Sisler und Blankenship, 1996). Das wohl Häufigste ist 1-Methylcyclopropan (1-MCP), welches ebenfalls gasförmig ist und mit Ethylen um die Bindestelle in den Ethylenrezeptoren konkurriert. Im Gegensatz zu Ethylen bewirkt 1-MCP keine Inaktivierung des Rezeptors (Negativregulator), wodurch die Ethylenantwort weiter unterdrückt wird. 1-MCP ist jedoch schlecht wasserlöslich und gasförmig. Es wird daher als Begasungsmittel eingesetzt, wodurch die Anwendung kompliziert ist. Neben Ethylenanaloga erwiesen sich Silberionen als effektive Inhibitoren der Rezeptoren. Es wird angenommen, dass diese anstelle des Kupfer-Kofaktors an die Ethylenrezeptoren binden und auf diese Weise die Ethylenbindestellen reduzieren (McDaniel und Binder, 2012). Der Einsatz von Silberionen stellt jedoch eine Freisetzung von Schwermetallen dar, welche insbesondere in Gewässern schädlich wirken (Flegall et

al., 1997). Zudem weisen Silberionen eine geringe Löslichkeit auf und müssen z. B. als Thiosulfatverbindungen eingesetzt werden (Veen und Geijn, 1978).

3.1.4 *NLS-derived Octapeptide-1 (NOP-1)*

Nicht nur CTR1, sondern auch der Zentralregulator EIN2 bildet einen Proteinkomplex mit ETR1 am ER (Bisson et al., 2009). Nach molekularbiologischer Untersuchung der Interaktion von EIN2 mit ETR1 konnte eine kurze Aminosäuresequenz im CEND, welche als *Nuclear Localization Signal* (NLS) bekannt ist, als essenziell ermittelt werden (Bisson und Groth, 2015). Diese Sequenz ist für die Relokalisation des CEND in den Zellkern nach proteolytischer Spaltung vom Membranteil von EIN2 verantwortlich. Die Sequenz des NLS ist auf Aminosäureebene in Pflanzen stark konserviert (Bisson et al., 2016). Ein aus dieser Sequenz abgeleitetes synthetisches Peptid mit der Aminosäuresequenz LKRYKRRL, das *NLS-derived Octapeptide 1* (NOP-1), stört die Interaktion zwischen EIN2 und ETR1 (Bisson und Groth, 2015). NOP-1 verzögert dadurch die Signalweiterleitung durch Ethylen, da ein essenzieller Komplex in der Signaltransduktion nicht ausgebildet werden kann. In Studien mit Tomaten und Äpfeln konnte eine Verzögerung der Fruchtreifung nach Behandlung mit NOP-1 beobachtet werden (Bisson et al., 2016; Klein et al., 2019). Der Mechanismus dieses neuartigen Ansatzes zur Regulation der Ethylenantwort in Pflanzen konnte auf molekularer Ebene aufgeklärt werden (Milic et al., 2018). NOP-1 bindet über saure Aminosäuren, wie Aspartat und Glutamat, an die GAF-Domäne des Rezeptors ETR1 (Milic et al., 2018). Diese Bindung führt vermutlich nicht nur zu einer Störung der ETR1-EIN2 Interaktion, sondern verhindert auch die Signalweiterleitung von der Transmembran- zur Kinasedomäne von ETR1 nach Bindung von Ethylen. Dadurch wird die Dephosphorylierung von EIN2 gestört und die Ethylenantwort verzögert.

3.2 Kupfer in Pflanzen

Durch die große Sauerstoffkrise vor 2,4 Milliarden Jahren begann evolutionär der Austausch von Eisen zu Kupfer als Kofaktor einiger Proteine, was eine Anpassung an die steigende Sauerstoffkonzentration in der Atmosphäre darstellte (Chapman und Schopf, 1983). Die Aufnahme von Eisen wurde durch dessen Reaktion mit Sauerstoff zum unlöslichen Eisen(III)oxid erschwert. So schritt neben der Entwicklung von neuen Aufnahmemechanismen für Eisen aus dem Boden auch die Substitution mit Kupfer voran, da dieses nun als Cu(II) zugänglich wurde (Robinson et al., 1999; Ridge et al., 2008). Nach Eisen ist Kupfer das häufigste Übergangsmetall in pflanzlichen Proteinen (Waters et al., 2012). Häufig wird hierbei das Potential des Redoxpaares $\text{Cu(II)} \leftrightarrow \text{Cu(I)}$ in ihrer Funktion als Elektronenüberträger genutzt. In der Atmungskette wird Kupfer als Kofaktor in Hämproteinen, z. B. der Cytochrom-c-Oxidase (COX), eingebaut und fungiert dort als Elektronenüberträger (Garcia et al., 2014). Für Pflanzen ist Kupfer vor allem als Bestandteil des in der Photosynthese essenziellen Proteins Plastocyanin (PC) zu finden. Plastocyanin dient dabei als Elektronenshuttle zwischen dem Cytochrom- b_6f -Komplex und dem Photosystem I (PSI) im Lumen der Thylakoide (Mira et al., 2002). Es ist das häufigste Kupferprotein in Pflanzen und der priorisierte Kupferakzeptor (Printz et al., 2016). Eine weitere wichtige Gruppe von Kupferproteinen in höheren Pflanzen sind die Ethylenrezeptoren. Bemerkenswerterweise wird hierbei jedoch nicht die Eigenschaft als redoxaktives Übergangsmetall genutzt, sondern die Fähigkeit von einwertigen Kupferionen Alkene hochselektiv zu binden (Burg und Burg, 1967; Masuda et al., 1987; Hirayama und Alonso, 2000). Dadurch erreichen Ethylenrezeptoren ihre hohe Spezifität und Affinität für das strukturell ansonsten einfache Ethylen.

Den Bedarf an Kupfer zu decken, stellt für den Organismus einen Balanceakt dar. Einerseits ist Kupfer ein essenzieller Bestandteil von Elektronentransferprozessen, andererseits ist es genau dieses Redox-Potential, welches für den Organismus eine Gefahr darstellt. Kupfer- und Eisenionen können direkt in Haber-Weiss/Fenton-Reaktionen partizipieren und zur Freisetzung von gefährlichen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führen (Kehrer, 2000). Die Kupferaufnahme und -verteilung ist daher streng reguliert, um eine Vergiftung durch das Spurenelement zu verhindern, die Bereitstellung jedoch zu sichern (Mira et al., 2002). Ein Mechanismus ist die Limitation von freiem Kupfer in der Zelle und das Eskortieren des Ions durch kupferbindende Proteine und Metaboliten wie z. B. Kupferchaperone, Metallothioneine, Phytochelatine, Glutathion und Ascorbat

(Freedman et al., 1989; Harris und Percival, 1991; Palmiter, 1998; Harrison et al., 1999; Cobbett und Goldsbrough, 2002). Für *S. cerevisiae* konnte ermittelt werden, dass die Menge an freiem Kupfer weniger als ein Ion pro Zelle beträgt bei einer intrazellulären Kupferkonzentration von 70 μM (Rae et al., 1999). Zudem besitzen alle Organismen zur Neutralisation von ROS sogenannte Superoxiddismutasen (SOD) (Alscher et al., 2002; Landis und Tower, 2005). Diese neutralisieren Superoxidionen ($\text{O}_2^{\cdot-}$) zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff. Das entstandene Wasserstoffperoxid wird von ebenfalls ubiquitär vorhandenen Katalasen weiter in Wasser und Sauerstoff überführt. Von Superoxiddismutasen gibt es in Pflanzen sowohl eine Form mit Eisen als Kofaktor (Fe-SOD), als auch eine Kupfer/Zink-abhängige Isoform (Cu/Zn-SOD) und zudem eine Mangan-haltige Variante (Mn-SOD). Es konnte gezeigt werden, dass je nach Verfügbarkeit der Kofaktoren in Pflanzen die Expression der Eisen- oder der Kupfer/Zink-abhängigen SOD hochreguliert wird (Alscher et al., 2002). Dies verdeutlicht die Anpassung von Pflanzen an die zunehmend sauerstoffhaltige Atmosphäre.

3.2.1 Lösliche Kupferchelatoren und -chaperone

Um das Vorkommen von freien Kupferionen zu verhindern, werden diese nach Transport in die Zelle umgehend von niedermolekularen Kupferchelatoren gebunden. Die beiden wichtigsten Gruppen bilden dabei die schwermetallbindenden Peptide, Metallothionein (MTs) und Phytochelatin (PC_n) (Cobbett und Goldsbrough, 2002). Metallothioneine sind kerncodierte cysteinreiche Peptide mit einem Molekulargewicht von 4 – 14 kDa, welche eine Vielzahl von Schwermetallen über Schwefelatome binden können. In höheren Pflanzen wurden Metallothioneine sowohl intrazellulär als auch im Phloem gefunden, wobei MTs stärker in den Wurzeln exprimiert werden (Palmiter, 1998; Guo et al., 2008). Phytochelatine (PC_n) sind Pseudopeptide welche aus einer Oligomerisierung von Glutathion (GSH) durch die Phytochelatin-Synthase hervorgehen (Schmöger, 2000; Cobbett und Goldsbrough, 2002). Dabei wird das Glycin des Tripeptids $\gamma\text{-Glu-L-Cys-Gly}$, aus welchem GSH besteht, abgespalten und um ein weiteres GSH-Molekül erweitert. Phytochelatine bestehen aus mindestens 2 (PC_2), höchstens aber 11 (PC_{11}) GSH-Einheiten. In Pflanzen konnten Schwermetallkomplexe von Phytochelatinen im Zytosol, sowie in der Vakuole gefunden werden (Schmöger, 2000; Cobbett und Goldsbrough, 2002). Die primäre Rolle von PC_n in Pflanzen wird in der Cadmiumhomöostase vermutet, jedoch bilden PC_n auch zahlreiche Komplexe mit Kupfer (Cu^+ und Cu^{2+}) und anderen Schwermetallen (Schmöger, 2000; Cobbett und Goldsbrough, 2002). MTs und PC_n sind

zusammen mit freiem GSH für die primäre Neutralisation von Schwermetallionen, darunter auch Kupferionen, nach dem Import dieser in die Zelle verantwortlich (Cobbett und Goldsbrough, 2002; Guo et al., 2008).

Der gerichtete Transport der Metallionen zu den kupferbenötigenden Zielstrukturen wird von einer Klasse hochaffiner und selektiver Kupferchaperone durchgeführt (Harrison et al., 1999). Das Kupferchaperon für Superoxiddismutase (CCS) ist essenziell für die Bereitstellung von Cu⁺ für die Cu/Zn-abhängigen Superoxiddismutasen (Rae et al., 1999). CCS versorgt in Pflanzen sowohl die zytosolische SOD als auch die chloroplastidäre SOD (CSD) mit Kupfer. Es ist unklar, ob es sich um verschiedene Transkripte desselben Gens oder zwei Translationsprodukte desselben Transkripts handelt (Abdel-Ghany et al., 2005). CCS bindet ein Kupferion durch ein ferredoxin-ähnliches $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ -Faltungsmuster, welches ein hochkonserviertes Kupferbindemotiv (MxCxxC) beinhaltet (Rosenzweig et al., 1999; Palumaa, 2013). CCS weist C-terminal noch eine zusätzliche Domäne auf, welche strukturell sehr ähnlich dem Zielprotein SOD ist, wobei allerdings die katalytisch essenziellen Reste fehlen (Lamb et al., 1999). Es wird daher eine regulatorische Funktion dieser Domäne angenommen, welche eine spezifische Erkennung des Zielproteins durch Nachahmung der Dimerisierungsfläche von SOD ermöglicht (Lamb et al., 1999).

Die mitochondriale Cytochrom-c-Oxidase (COX) benötigt durch ihre Lokalisation an der inneren Membran ebenfalls ein spezifisches Chaperon, welches den Kofaktor bereitstellt. Das *Cytochrom c Oxidase Copper Chaperone 1* (COX17 bzw. in *A. thaliana* COX17-1/2) ist ein kupferbindendes Protein, welches essenziell für eine funktionelle Assemblierung der Kupferzentren der COX ist. Eine Funktion als Kupferchaperon konnte für das Hefe-Homolog gezeigt werden. Dabei bleibt jedoch unklar, ob COX17 tatsächlich Kupfer aus dem Zytosol für COX bereitstellt oder ausschließlich als mitochondriales Kupferchaperon fungiert (Balandin und Castresana, 2002; Palumaa et al., 2004). COX17 bindet, im Gegensatz zu Kupferchaperonen mit ferredoxin-ähnlichem Faltungsmuster, zwei Kupferionen ebenfalls durch Cysteinreste, allerdings mit dem Motiv Cx₉C (Balandin und Castresana, 2002; Palumaa et al., 2004). Um die Bereitstellung des Kupfer-Kofaktors zu sichern, interagiert COX17 mit mehreren weiteren mitochondrialen Kupferchaperonen (Attallah et al., 2011).

Die Antioxidant 1 (ATX1)-Familie besteht ebenfalls aus Kupferchaperonen, welche ubiquitär im Zytosol lokalisiert sind. Diese weisen die gleichen strukturellen Merkmale wie der N-Terminus von CCS auf, was auf eine gemeinsame evolutionäre Herkunft deutet (Palumaa, 2013). Höhere Pflanzen besitzen zwei Homologe dieser Kupferchaperone,

Copper transport protein ATX1 (ATX1) und *Copper transport protein CCH* (CCH), welches über eine C-terminale Elongation von ca. 40 Aminosäuren verfügt (Puig et al., 2007). Die Struktur und Funktion dieser Elongation konnte bisher nicht eindeutig bestimmt werden (Mira et al., 2001b; Mira et al., 2004). Es wird aber eine duale Funktion der beiden Chaperone im pflanzlichen System angenommen. So geht man davon aus, dass ATX1 für die *intrazelluläre* Kupferverteilung verantwortlich ist, während CCH in der *interzellulären* Kupfermobilisierung eine Rolle spielt, z. B. beim Transport in die Sprossen nach Aufnahme durch die Wurzeln oder beim Abtransport aus seneszierenden Organen (Mira et al., 2001a; Printz et al., 2016). CCH wurde im vaskulären Gewebe und zellkernlosen Zellen gefunden, wodurch ein interzellulärer Langstreckentransport postuliert wird (Mira et al., 2001a). Im Gegensatz zu CCS und COX17 transportieren Chaperone der ATX1-Familie Kupfer nicht exklusiv zu einem Zielprotein, sondern interagieren mit einer ganzen Familie von membranständigen Schwermetall-ATPasen, den *Heavy Metal ATPases* (s. a. Abschnitt 2.2.2). Für *A. thaliana* konnten bisher HEAVY METAL ATPase 5 (AtHMA5) und RESPONSIVE TO ANTAGONIST 1 (RAN1, auch AtHMA7 genannt) als Interaktionspartner charakterisiert werden, während für *Oryza sativa* (Reis) Interaktionen von ATX1 mit OsHMA4, OsHMA5, OsHMA6 und OsHMA9 gezeigt werden konnten (Andres-Colas et al., 2006; Puig et al., 2007; Shin et al., 2012; Li et al., 2017b; Zhang et al., 2018). Durch das Zusammenspiel mit diesen Transportern sichern ATX1 und CCH die Kupferverteilung und -bereitstellung in der Zelle und tragen so zur Kupferhomöostase bei (Zhang et al., 2018).

3.2.2 Kupfertransportierende P_{1B}-Typ ATPasen

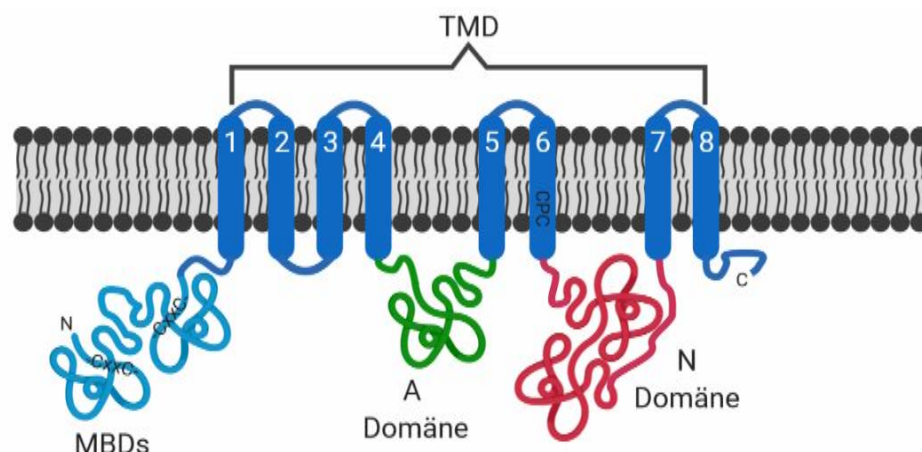


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Aufbaus von pflanzlichen kupfertransportierenden ATPasen am Beispiel von RAN1. Alle pflanzlichen HMAs besitzen einen ähnlichen grundlegenden Aufbau bestehend aus acht Transmembranhelices (TMD) mit einem für kupfertransportierende ATPasen essenziellen CPC-Motiv in Helix 6. N-terminal, selten auch C-terminal, besitzen HMAs große lösliche Domänen mit ATX1-ähnlichem Faltungsmuster. Diese weisen konservierte Kupferbindemotive auf (CxxC). Zwischen Helix 4 und 5 liegt eine für die Regulation wichtige Aktuator-Domäne (A-Domäne). Die ATP-Bindedomäne, sowie die Phosphorylierungsdomäne bilden eine großen zytosolischen Teil zwischen Helix 6 und 7 (N-Domäne). Erstellt mit BioRender (biorender.com).

Kupfertransportierende P_{1B}-Typ ATPasen stellen eine Untergruppe der P-Typ-ATPasen dar, welche spezifisch den Transport von Schwermetallionen unter ATP-Verbrauch katalysieren (Mira et al., 2002). Aufgrund dessen werden diese häufig auch Heavy Metal ATPases, kurz HMAs, genannt. In *A. thaliana* wurden bisher acht HMAs gefunden, von denen HMA5 bis HMA8 Cu⁺ transportieren. Alle HMAs teilen einen ähnlichen strukturellen und topologischen Aufbau (Abbildung 4) (Mira et al., 2002). Kupfertransportierende HMAs besitzen große N- und/oder C-terminale lösliche Domänen (MBD) mit ATX1-ähnlichen Faltungsmuster, welche Kupfer ebenfalls über CxxC-Motive binden können. Der Membranbereich, bestehend aus acht Transmembranhelices (TMD), bildet das Translokon. Ein in allen kupfertransportierenden HMAs vorkommendes CPC-Motiv in Helix 6 ist für die Translokation essenziell. Außerdem weisen HMAs eine ATP-Bindedomäne und Phosphorylierungsdmäne (N-Domäne) und eine regulatorische Aktuator-Domäne (A-Domäne) auf. Ein hochkonserviertes CPC-Motiv in Helix 6 ist für die Translokation von Kupfer essenziell. HMA5 ist als einzige kupfertransportierende ATPase an der Plasmamembran lokalisiert (Andres-Colas et al., 2006). Aufgrund des verstärkten Vorkommens in Wurzelzellen und der Hochregulation bei Kupferüberschuss wird davon ausgegangen, dass HMA5 ein Kupferexporter ist und an der Entgiftung von Kupfer beteiligt ist (del Pozo et al., 2010). Zudem konnte HMA5 und ein Homolog aus Reis, OsHMA4, im Tonoplasten bzw. in der Vakuole nachgewiesen werden (Li et al., 2017a). Diese duale Lokalisation von HMA5 weist auf eine generelle Funktion im Kupferefflux aus dem Zytosol hin. Die Kupferionen werden entweder ins Xylem zur Versorgung umliegender Zellen, oder in die Vakuole zur intrazellulären Speicherung transportiert (Andres-Colas et al., 2006; del Pozo et al., 2010; Zhang et al., 2018). HMA6 und HMA8, auch PAA1 und PAA2 genannt, sind in den Membranen der Chloroplasten lokalisiert und an der Bereitstellung von Kupfer für die CSD und Plastocyanin verantwortlich (Shikanai et al., 2003). HMA6 sitzt in der inneren Membran der Chloroplasten und transportiert Kupfer ins Stroma, wo es u. A. von CCS an CSD weitergegeben wird (Shikanai et al., 2003). Außerdem liefert HMA6 Kupfer an HMA8, welches in der Membran der Thylakoide lokalisiert ist und Kupfer an Plastocyanin übergibt (Tapken et al., 2012). HMA7, auch RESPONSIVE TO ANTAGONIST 1 (RAN1) genannt, ist an der Bereitstellung von Kupfer für die Ethylenrezeptoren beteiligt und wurde ursprünglich in *Triple Response* Assays charakterisiert (Hirayama et al., 1999; Li et al., 2017b). In Anwesenheit des Rezeptorantagonisten trans-Cycloocten zeigen Mutanten von *ran1* in *A. thaliana* die

Ethylen-Dreifach-Antwort (Hirayama et al., 1999). Dies stellte die erste experimentelle Verbindung zwischen dem Ethylensignalweg und Kupfer her, obwohl die Beteiligung eines Übergangsmetalls an der Ethylenbindung bereits in den 60er Jahren postuliert wurde (Burg und Burg, 1967). Schwierig zu deuten blieb der Umstand, dass die identifizierten T-DNA-Linien von *A. thaliana*, *ran1-1* und *ran1-2*, in Abwesenheit des Rezeptorantagonisten eine wildtypische Ethylenantwort zeigen (Binder et al., 2010). Homologe von RAN1 sind das aus Hefe stammenden *ccc2*, sowie die humanen Menkes und Wilson Proteine ATP7A und ATP7B. Für beide Homologe konnte der Golgi-Apparat als präferierte subzelluläre Lokalisation bestimmt werden. In Abhängigkeit von Kupfer kann ATP7A allerdings auch zwischen dem post-Golgi und der Plasmamembran pendeln (Petris et al., 1996). Dies dient vermutlich der Aufrechterhaltung der Kupferhomöostase. Eine zu den Homologen ähnliche Lokalisation wurde für RAN1 angenommen. Lokalisationsstudien von RAN1 konnten jedoch keine eindeutige Lokalisation im Golgi bzw. in der Plasmamembran zeigen (Li et al., 2017b). Lediglich eine Lokalisation im Endomembransystem ohne genauere Spezifizierung wurde beschrieben (Li et al., 2017b).

3.2.3 Kupferhomöostase in höheren Pflanzen

Die Kupferaufnahme und -verteilung stellt in Pflanzen ein hochkomplexes Netzwerk aus membranständigen Transportern, löslichen Kupferchaperonen und niedermolekularen Chelatoren dar. In Abbildung 5 sind die für diese Arbeit relevanten Kupfertransportwege dargestellt. Cu(II) wird von Metalloreduktasen der FRO- (*Ferric reductase oxidase*) Familie zu Cu(I) reduziert und durch *Copper transporter 1* und *2* (COPT1/2) in die Zelle importiert (Yuan et al., 2011; Jain et al., 2014). Dort nehmen zunächst die niedermolekularen Metallchelatoren MT, GSH und PC_n die Kupferionen in Empfang (Cobbett, 2000; Guo et al., 2008; Leszczyszyn et al., 2013). Die löslichen Kupferchaperone CCS, COX17, ATX1 und CCH übernehmen das Kupfer und eskortieren dieses zu ihren jeweiligen Zielproteinen. Ein Spezialfall stellt das *Plastid Chaperone 1* (PCH1) dar. Dieses geht aus einem alternativen Spleißereignis des Transkripts von HMA6 (PAA1) hervor und besteht lediglich aus der Chloroplastensignalsequenz und der N-terminalen, löslichen Domäne von HMA6, welches gleichzeitig das spezifische Target darstellt (Blaby-Haas et al., 2014). HMA5 transportiert Kupfer aus dem Zytosol heraus, entweder in den extrazellulären Raum oder in die Vakuole, welche den intrazellulären Kupferspeicherort darstellt. Die Freisetzung von Kupfer aus der Vakuole erfolgt durch *Copper transporter 5* (COPT5) (Klaumann et al., 2011). Dieses Netzwerk gewährleistet die Bereitstellung von

Kupferionen in allen Zellkompartimenten unter Minimierung der toxischen Effekte des Schwermetalls. Die Aufrechterhaltung der Kupferhomöostase in Pflanzenzellen ist hochkomplex und die isolierte Betrachtung der Verteilung eines Schwermetalls gibt nicht das Gesamtbild wieder, da insbesondere die Metalle Eisen und Zink regulierenden Einfluss auf die Kupferhomöostase zeigen (Chaignon et al., 2002; Yuan et al., 2011; Waters et al., 2012; Malasarn et al., 2013). Vielmehr nimmt die Zelle stets das Gesamtbild an Schwermetallverfügbarkeit und -bedarf wahr. Im Falle von Eisen wird bei Mangel beispielsweise zum Ausgleich die Expression der Cu/Zn-SOD hochreguliert (Alscher et al., 2002). Im Gegensatz dazu wird bei Zinkmangel die Kupferaufnahme gedrosselt, vermutlich um eine Fehlbesetzung von Zinkbindestellen in Proteinen durch Kupfer zu verhindern (Malasarn et al., 2013).

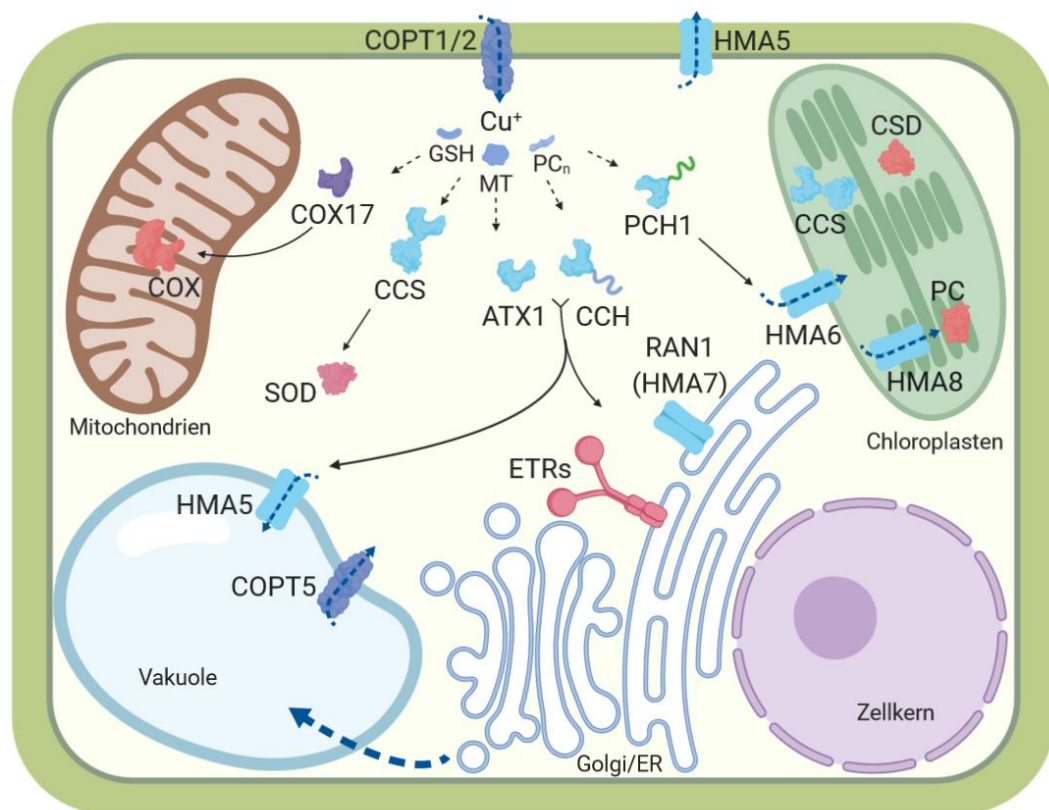


Abbildung 5: Die wichtigsten Kupferproteine und Transportwege in der pflanzlichen Kupferhomöostase im Überblick. Blau dargestellt sind kupfertransportierende Proteine. Rot dargestellt sind Zielproteine, welche Kupfer als Kofaktor benötigen. Kupfer wird durch die Kupfertransporter COPT1 und COPT2 in die Zelle importiert, wo es unmittelbar durch Metallothioneine (MT), Glutathion (GSH) oder Phytochelatine (PC_n, n = 2 bis 11) gebunden wird. Hochaffine Kupferchaperone übernehmen das Kupfer und eskortieren es zum Zielprotein. Die wichtigsten Kupferproteine in Pflanzen stellen dabei SOD, CSD, COX, Plastocyanin und Ethylenrezeptoren dar. Die zytosolische SOD und die chloroplastidäre CSD erhalten ihren Kofaktor durch CCS. Eine Spleißvariante von HMA6, PCH1, transportiert Kupfer zu HMA6. Dort wird es von CCS und der HMA8 benötigt, um Kupferionen zu Plastocyanin und CSD zu transportieren. Cox17 versorgt die mitochondriale COX mit dem essenziellen Kofaktor. Die Kupferchaperone ATX1 und CCH sind ebenfalls an der Kupferverteilung beteiligt. Beide Chaperone interagieren mit HMA5 und RAN1. RAN1 stellt Kupfer für die ER-ständigen Ethylenrezeptoren bereit, während HMA5 für den Efflux von Kupfer aus dem Zytosol verantwortlich ist. Copper Transporter 5 (COPT5) setzt Kupfer aus der Vakuole frei. Erstellt mit BioRender (biorender.com).

4 Zielsetzung

Aufgrund der vielfältigen Wirkung von Ethylen auf Pflanzenprozesse, wie z. B. die Fruchtreifung, ist die Forschung und die gezielte Manipulation der zu Grunde liegenden Signalkette von großem wissenschaftlichen, aber auch agronomischen Interesse. Die Schlüsselproteine in der Signalwahrnehmung und Signalweiterleitung sind dabei die ER-ständigen Ethylenrezeptoren, sowie der Zentralregulator EIN2. Bisherige Ansätze zur Hemmung des Ethylensignalweges fokussieren sich entweder auf die Inhibition der Ethylenbiosynthese oder beeinflussen die Bindung des Liganden an die Rezeptoren selbst. Aus Studien zur Interaktion von ETR1 und EIN2 ging ein neuartiges Peptid hervor, welches inhibierend auf die Formierung des ETR1-EIN2-Komplexes wirkt. Dieses Peptid, genannt NOP-1, konnte die Fruchtreifung von Tomaten und Äpfeln nach der Ernte verzögern. Ein Ziel dieser Arbeit ist es am Beispiel von Schnittblumen zu überprüfen, ob der inhibierende Mechanismus von NOP-1 auf weitere Spezies und ethylenregulierte Prozesse übertragen werden kann. Dazu soll in dieser Arbeit die Wirkung von NOP-1 auf die Seneszenz von Blüten der Schnittblumen von Nelken und Rosen untersucht werden. Des Weiteren soll ETR1 aus der Nelke rekombinant in *E. coli* hergestellt werden und die Interaktion mit EIN2 und NOP-1 durch Bindungsstudien analysiert werden.

Zur hochaffinen Bindung von Ethylen an die Rezeptoren ist ein Kupfer-Kofaktor essenziell. Aufgrund der zytotoxischen Eigenschaften des Übergangsmetalls, sowie des Redox-Potentials, das zur unerwünschten Bildung von ROS führen kann, wird Kupfer von speziellen Proteinen durch die Zelle eskortiert. Ein weiteres Thema in dieser Arbeit ist daher die Untersuchung, wie Kupfer für Ethylenrezeptoren bereitgestellt wird. Dazu sollen die löslichen Kupferchaperone ATX1 und CCH, sowie die kupfertransportierende ATPase RAN1 aus *A. thaliana* rekombinant in *E. coli* hergestellt, gereinigt und charakterisiert werden. Des Weiteren soll die subzelluläre Lokalisation dieser Proteine durch transiente Expression in *N. benthamiana* bestimmt werden. Durch Kombination von *in vitro* und *in vivo* Interaktionsstudien der Kupferchaperone ATX1 und CCH, der kupfertransportierenden P_{1B}-Typ ATPase RAN1 und der Ethylenrezeptoren ETR1 und ERS1, soll der Transport von Kupfer zu den Ethylenrezeptoren untersucht werden. Auf diese Weise soll identifiziert werden, wie Kupfer für die Ethylenrezeptoren bereitgestellt wird.

Außerdem sollen in dieser Arbeit neue Erkenntnisse über pflanzliche Kupferchaperone der ATX1-Familie gewonnen werden. Nur höhere Pflanzen verfügen über zwei Isoformen

dieser Kupferchaperone: ATX1 und CCH. CCH unterscheidet sich dabei durch eine C-terminale Elongation von ca. 40 Aminosäuren. Die Funktion von CCH wird im interzellulären Langstreckentransport von Kupfer vermutet. CCH mobilisiert Kupfer aus seneszierenden in junge Organe der Pflanze.

Ob und welche Rolle dabei die C-terminale Elongation von CCH spielt ist unklar. Durch vergleichende strukturelle und funktionelle Studien an ATX1, CCH, sowie einer Deletionsmutante von CCH, CCH Δ , sollen Eigenschaften der C-terminalen Elongation bestimmt werden, welche die Funktion von CCH als Langstreckentransporter erklären. Hierzu sollen die rekombinant hergestellten Kupferchaperone molekularbiologisch untersucht werden, sowie durch transiente Expression in *N. benthamiana* ihre subzelluläre Lokalisation untersucht werden.

5 Ergebnisse

5.1 NOP-1, ein vom Zentralregulator EIN2 abgeleitetes Peptid, verlängert die Haltbarkeit von Schnittblumen

Titel: Cut flowers that last: Peptide NOP-1 derived from a central regulator of ethylene signalling delays flower senescence

Autoren: Claudia Hoppen, Lena Müller, Anna Christina Albrecht und Georg Groth

Eigener Anteil: 30%, Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente, Schreiben des Manuskripts

Veröffentlicht in: Scientific Reports 9, Artikelnummer 1287, Creative Commons Attribution 4.0 International License

DOI: 10.1038/s41598-018-37571-x, Februar 2019

Impact Factor 2018 (5 year): 4.525

Cut flowers that last: Peptide NOP-1 derived from a central regulator of ethylene signalling delays flower senescence

Abstract

The plant hormone ethylene was identified as important triggering factor and primary regulator of flower senescence in many species. Consequently, application of chemical inhibitors of ethylene biosynthesis and action is used to extend the longevity of ethylene-sensitive flowers. Here, we show that the peptide NOP-1, a biological derived from the nuclear localization signal of ethylene regulator EIN2 tightly binds to the ethylene receptor of carnation plants - a model to study flower senescence. When applied on cut flowers the peptide biological delays petal senescence similar to previously identified and currently used chemical inhibitors, but offers significant advances to these chemicals in biodegradability, sustainability and ecotoxicity. Our bioinformatic analysis of a wide range of ethylene receptors indicates complete sequence conservation of the anticipated NOP-1 binding site in flower species supporting a widespread use of the peptide on flowering ornamentals to delay senescence and decay in cut flowers. We anticipate our innovative approach to extend flower longevity by a new class of biomolecules such as peptides, peptide analogues and peptide mimetics will significantly advance our technological capability to delay flower senescence and expand vase-life of cut flowers in a sustainable and environmentally friendly manner.

Introduction

Flower senescence is a tightly regulated developmental process that plays a crucial role in the overall reproductive strategy of many plants. Initial work on this developmental process was motivated primarily by the commercial interest in increasing the life time of cut flowers which according to import statistics reported to United Nations (UN) show an overall world trade value of around 4 billion USD. Europe (66.7%), the US (19.3%) and Japan (10.7%) form the three most important floriculture consumption regions in this market. Globally, both, traders and customers, demand for cut flowers with a long vase-life no matter whether those have already experienced long-distance transport from their cultivation areas in Latin America or Eastern Africa. Accordingly, chemicals or processes that decelerate or delay flower senescence are of broad social and economic interest.

Identification of the plant hormone ethylene as primary regulator of carnation senescence[1] and the drastic extension of life of petals after treatment of cut flowers by inhibitors of ethylene biosynthesis[2] or ethylene action inhibitors resulted in a range of commercial treatments to extend the vase life of cut flowers[3]. Small molecule inhibitors amino-ethoxyvinyl glycine (AVG) and amino-oxyacetic acid (AOA) which interfere with ethylene biosynthesis have been shown effective in blocking ethylene production that accompanies senescence. Consequently, a number of commercial products based on these chemicals have been introduced to the market to delay floral senescence and abscission [4-8]. However, these inhibitors are ineffective in preventing the effects of exogenous ethylene on flower senescence during transport and storage. Hence, more commercial interest was received for inhibitors blocking ethylene perception such as silver ions [3] and the cyclopropene derivative 1-MCP [9]. Silver salts which were shown to decrease the number of active ethylene binding sites and alter signal output of the receptors [10] have been an industry standard for preventing ethylene action in ornamentals for decades. But nowadays the use of the heavy metal pollutant is banned in many countries due to serious concerns about its potential as a groundwater pollutant. In recent years, the cyclic olefine 1-MCP has been widely adopted in the ornamental plant industry as a non-toxic alternative to silver salts, although it does not control senescence for as long as silver ions when applied in a single treatment. However, repetitive treatments with the gaseous inhibitor resulted in a marked increase in vase life and efficiently blocked floral senescence of cut flower [11]. Hence, 1-MCP today is widely used as ethylene action inhibitor at a wide range of ornamental plants [12] which due to the gaseous character of the inhibitor are treated in enclosed, gas-tight areas. The inhibitor was shown to be highly efficient at very small concentrations [12], although treatment depends on temperature achieving complete inhibition at 20°C, but almost no inhibition at 0°C [13]. In addition to chemical treatments, transgenic approaches targeting ethylene biosynthesis or ethylene signaling were applied to extend flower vase life[14, 15]. Overall, each method comes with its own chances and drawbacks [16]. Hence, a sustainable and easy-to-use method to improve longevity of cut flower has not been found yet.

The different strategies developed in the past to delay floral senescence have been used on a wide range of ornamental plants. However, among ethylene-sensitive flowers carnations are probably the most studied model system [13, 17, 18] as they are highly

sensitive and rapidly respond to the plant hormone by clear physiological and morphological changes which can be studied even on individual petals[19].

Much of the current knowledge on ethylene perception and transduction has been established by physiological, biochemical and genetic studies in the small crucifer weed *Arabidopsis*, and crops such as tomato or rice. These studies clarified that ethylene is perceived by a family of receptor proteins (ETRs), which form homo- and heterodimers at the ER membrane[20-23]. Although the exact output of the receptors is still obscure, genetic and biochemical studies established that in the absence of ethylene, a receptor associated kinase (CTR1) phosphorylates a central regulator of the signaling cascade (EIN2). Conversely, in the presence of ethylene the CTR1 kinase is inactivated leading to dephosphorylation of EIN2[24]. In turn, the EIN2 C-terminal domain (aa 462-1294) containing a highly conserved nuclear localization signal[25, 26], is processed by a so far unknown protease and translocated to the nucleus [24, 26, 27] where it activates a variety of ethylene response genes and phenotypes. Recent studies in our lab propose an efficient way to interfere with ethylene signaling based on a yet unknown function of the nuclear localization signal (NLS) in EIN2. Peptides mimicking this NLS motif were shown to affect ethylene responses in *Arabidopsis* and also function as potent inhibitor of tomato fruit ripening [28, 29].

Results and Discussion

To clarify whether NOP-1 also has the potential to serve as an inhibitor of senescence in cut flowers, we applied the peptide on cut carnations (*Dianthus caryophyllus*) and analyzed the effect on floral senescence in this model ethylene response system[9, 13, 17, 30]. In analogy to treatment with the chemical senescence inhibitor STS containing silver ions as active ingredient which target plant ethylene receptors[31] the peptide was directly supplied to the vase water. Senescence was monitored visually, throughout the experiment and quantified by changes observed in petal size and/or color (Figure 1 A-B). While controls with no additions to vase water show a clear senescence phenotype of petal inrolling and petal fading after 6 days (Figure 1A, upper panel), the addition of 1 mM silver salt delays the appearance of these morphological manifestations by several days and petals show almost no signs of senescence after 15 days (Figure 1A, middle panel). Similarly, addition of NOP-1 peptide at 0.5 mM concentration clearly delays the onset of petal senescence and significantly increases flower longevity, although the delay is shorter than observed with the potent silver salt inhibitor (Figure 1A, lower panel).

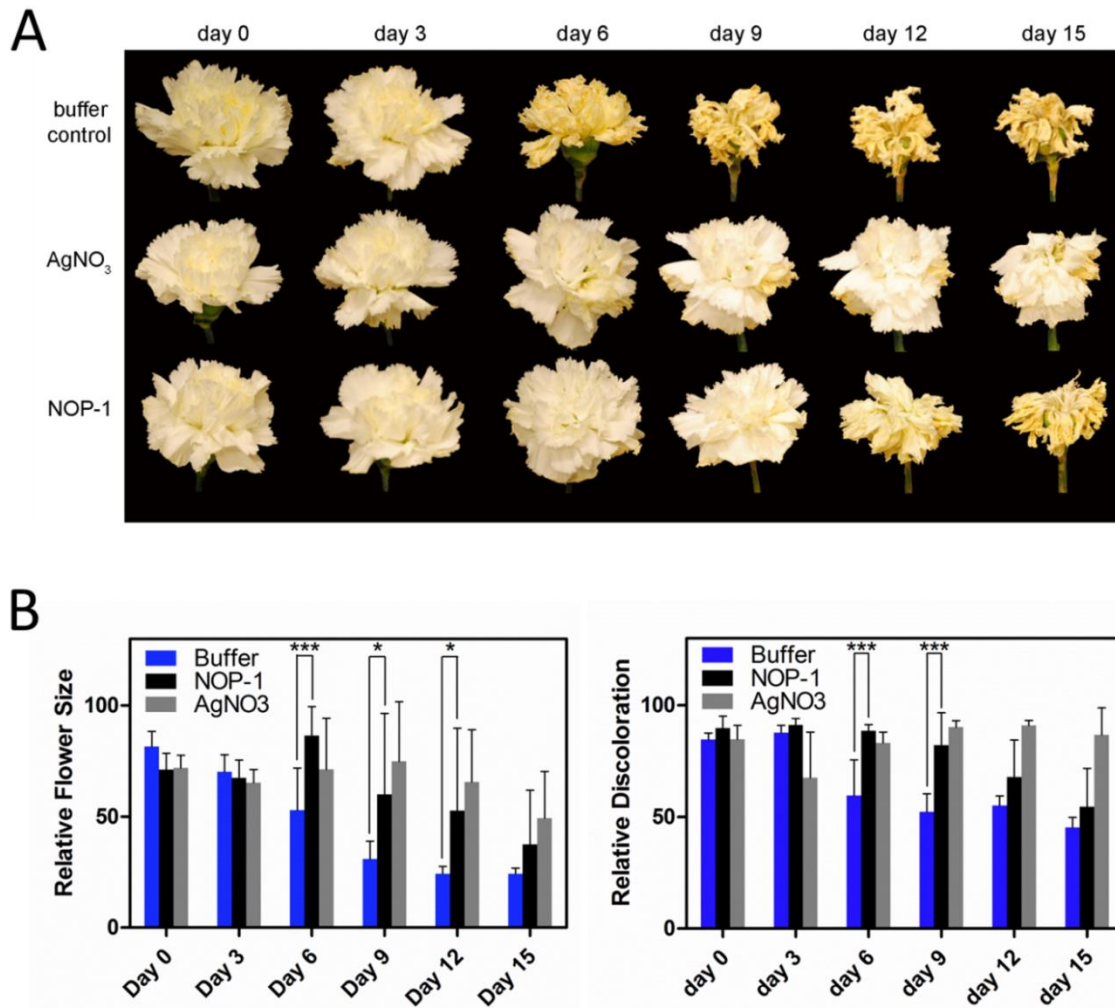


Figure 1 Effect of small molecule inhibitors of ethylene signaling on flower senescence of cut carnations. A) Visual images of carnation cut flowers treated with senescence inhibitor silver nitrate or peptide NOP-1. Representative photos of carnation petals treated with 1 mM silver nitrate or 0.5 mM NOP-1 on DAT 0, 3, 6, 9, 12 and 15. Controls treated with buffer only are depicted in the upper row. B) Quantitative analysis of flower size (left) and petal color change (right) of carnation flowers after treatment with silver salt, NOP-1 peptide or buffer-only. Asterisks indicate significance level (***) 99 %, (*) 90 %) using Student's t-test.

To further substantiate the effect of the peptide biological on floral senescence observed with the carnation model system, we used roses as another species of highly ethylene sensitive ornamental plants. Similar to carnations untreated roses showed obvious signs of senescence such as wilting and petal bending by day 6 (Figure 2A, upper panel). The untreated controls completely ended their vase life on day 9 due to these morphological changes. In contrast, cut roses treated with the silver salt inhibitor (Figure 2A, middle panel) and flowers treated with the NOP-1 peptide (Figure 2A, lower panel) showed a prolonged vase life of about 6-8 days relative to buffer controls. While the silver salt chemical inhibitor was noticeably more efficient in extending the vase life of cut carnations than the peptide biological (Figure 1B), the difference on flower longevity

between both treatments is less pronounced for cut roses (Figure 2B). Nevertheless, on the entire trial period, NOP-1 was less effective than the silver treatment similar to what is seen for carnation. Noteworthy, no beneficial effect on flower longevity was observed by multiple treatments with the NOP-1 peptide in contrast to studies with the gaseous ethylene antagonist 1-MCP which significantly delayed flower senescence when applied on a daily basis [11]. Hence, further testing remains to be done to uncover the full potential of the peptide biological in order to identify optimum treatment conditions (concentration, duration, temperature) and strategies for efficient application.

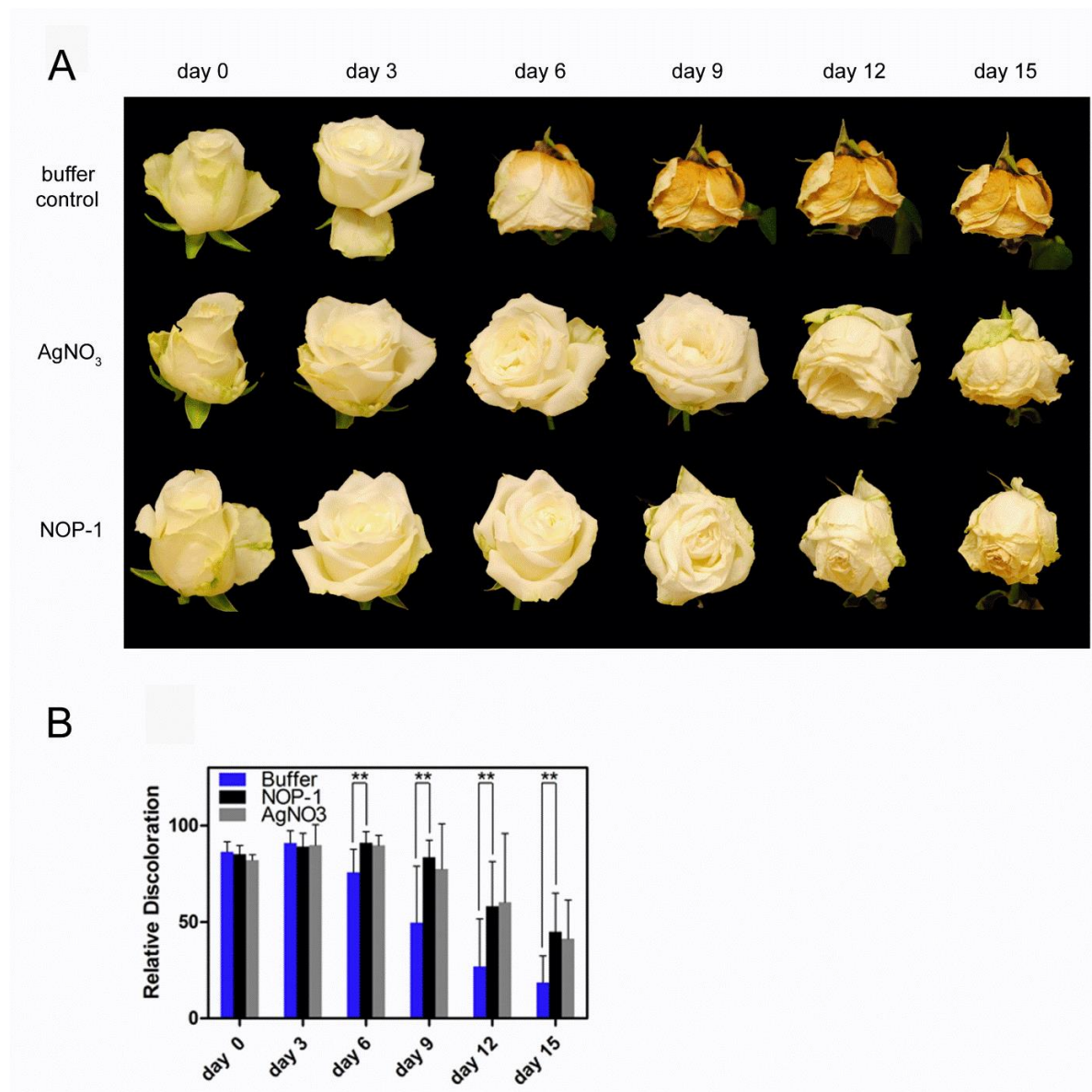


Figure 2 Effect of small molecule inhibitors of ethylene signaling on flower senescence of cut roses. A) Images of cut roses treated with senescence inhibitors silver nitrate or NOP-1, respectively. Representative photos of rose ornamentals treated with 1 mM silver nitrate or 0.5 mM NOP-1 on DAT 0, 3, 6, 9, 12 and 15. Controls treated with buffer only are depicted in the upper row. B) Quantitative analysis of color change in petals after treatment with silver salt, NOP-1 peptide or buffer-only. Asterisks indicate significance level (** 95 %) using Student's t-test.

To demonstrate uptake of the peptide from the vase water and vascular transport to petals fluorescently labeled NOP-1 was used. To this end, dansylated NOP-1 was added directly to the vase water of cut carnation flowers at 1 mM concentration. Confocal microscopy and spectroscopic analysis of mock- and NOP-1 treated flowers clearly demonstrate significant accumulation of the peptide in petal cells (Figure 3). Consequently, this also verifies efficient transport of the NOP-1 peptide across the vascular system. No fluorescence was detected in mock controls. Moreover, we noted that there is no indication of cytotoxic effects on carnation cells by NOP-1 or dansylated NOP-1.

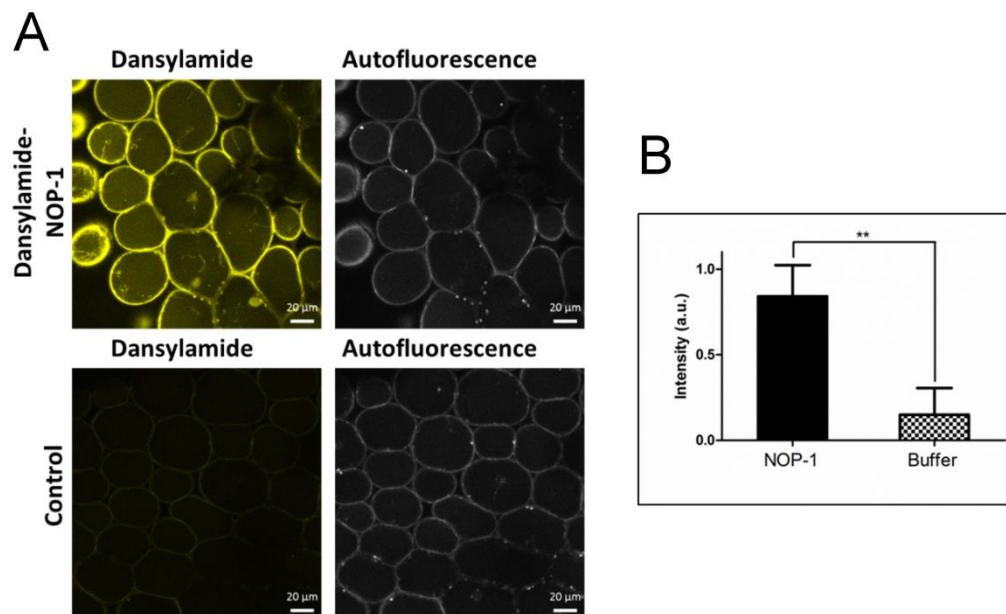


Figure 3 Detection of uptake and transport of fluorescently-labelled NOP-1 to petals A) Confocal imaging of carnation petals from plants watered for 3 days with a solution of 1 mM dansylamide-labeled NOP-1 or buffer-only, respectively. Uptake of the NOP-1 peptide from the vase water to the petal cells was visualized by the dansyl fluorophore. B) Dansyl content in treated and untreated petals quantified by UV absorption spectroscopy (right).

To elucidate the mode of action of NOP-1 on flower senescence and to determine whether the peptide biological works by the same molecular mechanism as determined for NOP-1 controlled ripening delay, we initiated interaction studies of the carnation ethylene receptor DcETR1, the central regulator of the ethylene signaling cascade EIN2 and the NOP-1 peptide. To this end, DcETR1 was cloned in *E. coli*, expressed and purified according to protocols established in our lab [32] for ethylene receptors from *Arabidopsis thaliana*, *Physcomitrella patens*, tomato and apple (Supplementary Figure S1). Functional folding of the recombinant purified proteins was demonstrated by CD spectroscopy (Supplementary Figure S2) and purified DcETR1 was labeled with fluorescent dye AlexaFluor488. To determine binding affinity and dissociation constants of the purified

recombinant proteins and the NOP-1 peptide we used microscale thermophoresis. In these experiments we observed tight binding of the DcETR1 receptor to the EIN2 ethylene central regulator (Figure 4A, $K_D = 135.9 \text{ nM} \pm 0.35 \text{ nM}$) as previously observed for the interaction of the corresponding proteins from *Arabidopsis* and tomato [29, 33]. These data indicate a high affinity and central protein protein interaction (PPI) common in ethylene signaling among plant species. Consequently, targeting this interaction by small-molecule modulators has the potential to shut down ethylene signaling and related plant responses. Therefore, we tested binding of the ripening delaying peptide NOP-1 identified in previous studies to target the ETR1-EIN2 complex with our purified carnation receptor DcETR1. Our data on the carnation protein confirm binding of the peptide biological at similar affinities (Figure 4B, $K_D = 3.49 \text{ } \mu\text{M} \pm 0.55 \text{ } \mu\text{M}$) as earlier observed for *Arabidopsis* and tomato receptors [29, 34].

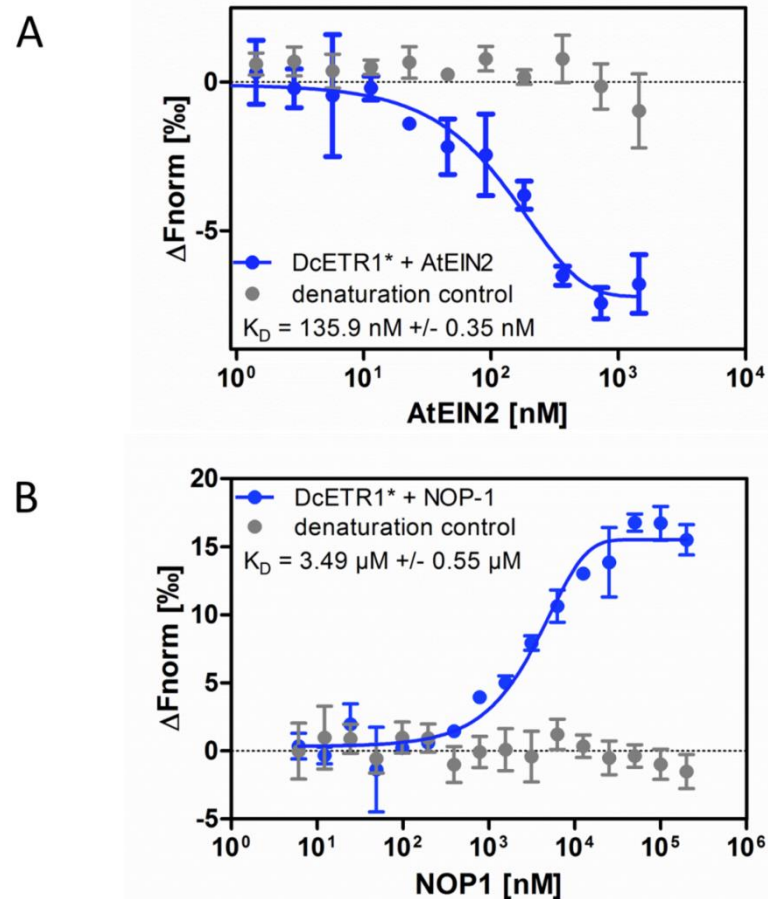


Figure 4 Molecular binding studies of carnation ethylene receptor DcETR1. A) Microscale Thermophoresis (MST) binding studies using recombinant carnation ethylene receptor DcETR1 and AtEIN2. Titration of unlabeled AtEIN2 to labeled DcETR1 (●) revealed binding of both proteins at a dissociation constant (K_D) of $135 \text{ nM} \pm 0.35 \text{ nM}$, indicating a tight interaction between DcETR1 and AtEIN2. **B)** MST binding studies on DcETR1 and NOP-1. Titration of unlabeled NOP-1 to labeled DcETR1 (●) resulted in a K_D of $3.49 \text{ } \mu\text{M} \pm 0.55 \text{ } \mu\text{M}$. Asterisks (*) indicate the labeling of DcETR1 with AlexaFluor488-NHS. Negative controls using chemically denatured DcETR1 shows no interaction with the EIN2 protein or the NOP-1 peptide (●).

The precise interaction site of NOP-1 at the *Arabidopsis* ETR1 receptor was recently resolved in our lab by molecular and computational studies [34]. In these studies, we uncovered binding of the peptide biological at the GAF domain of the receptor. Based on the resolved binding site and binding mode we proposed that the bound peptide arrests intra- and intermolecular downstream signaling in the receptor resulting in the observed ripening inhibition. To verify that the NOP-1 binding site identified in the *Arabidopsis* ETR1 receptor is also present in ethylene receptors of cut flowers and ornamental plants, we compared the corresponding sequence (aa 143-174 in *Arabidopsis*) in 17 flowering ornamentals widely used as cut flowers. Remarkably, all tested varieties show an identical protein sequence (Figure 5).

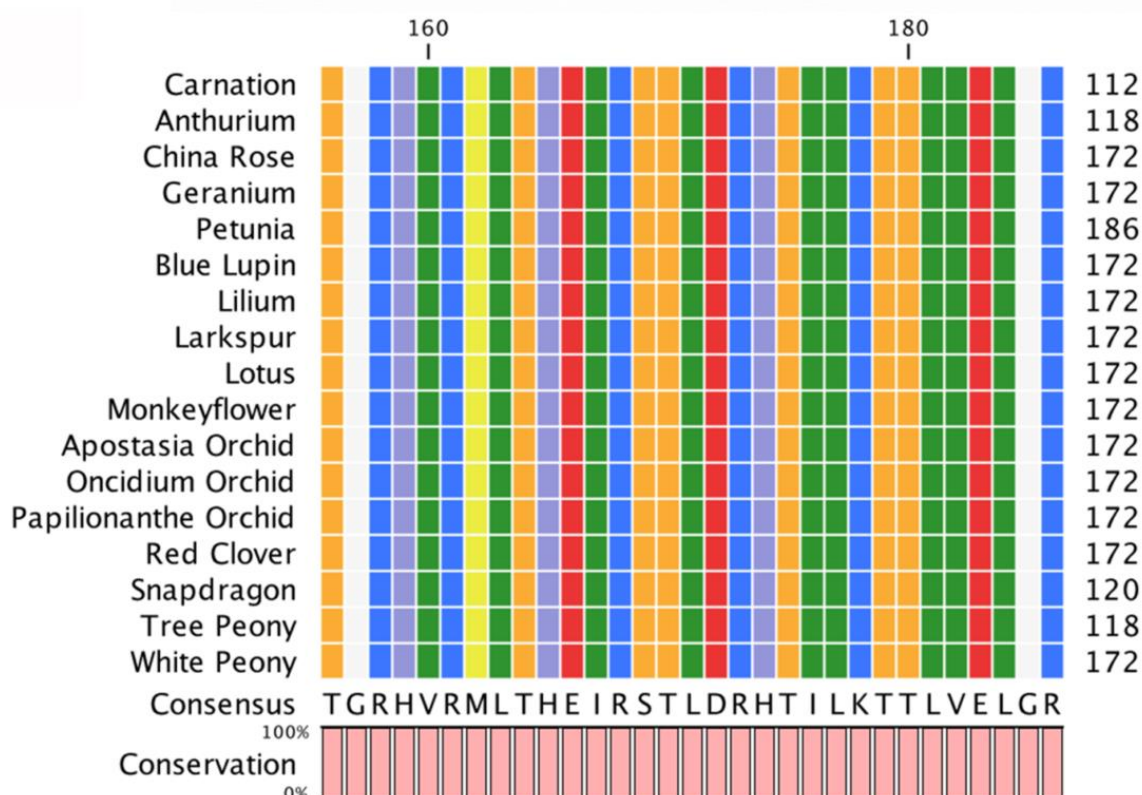


Figure 5 Conservation of NOP-1 binding site in ethylene receptors. Alignment of the proposed NOP-1 binding site in the GAF domain of ETR1 receptors from flowering ornamentals used as cut flowers. For accession numbers and the complete alignment see the Material and Methods section and Supplemental Data Figure S3.

The extreme conservation found in this part of the receptor (see also Supplementary Figure S3) further emphasizes a potential critical role of this element in downstream signal transfer. Moreover, the exact match of this patch in the receptors of different flower species supports a general usage of NOP-1 as a senescence inhibitor in a variety of cut flowers without the need to genetically engineer ornamental plants in ethylene biosynthesis or perception.

Compared to current approaches to expand the vase-life of cut flowers, NOP-1 offers a number of advantages, such as application as aqueous solution, ultimate biodegradability, sustainability and low ecotoxicity due to the lack of adverse effects to the environment. In contrast, silver salts although they offer long lasting senescence protection have various drawbacks. As a heavy metal they are highly toxic and harmful to the environment, persist in soil and groundwater for long periods and pollute drinking water[35]. 1-MCP, another senescence inhibitor used to extend longevity of cut flowers, lacks most of these disadvantages, is easy to dispose and safe, but as a gas is active by fumigation only complicating its usage on cut flowers. Hence, the peptide biological NOP-1 combines the strengths of current senescence inhibitors and thereby offers an alternative and sustainable approach to prolong the vase-life of cut flowers. To further improve the effect on the vase-life of cut flowers, additional studies on more flower species and variants of the NOP-1 biological (peptide length, stability, modifications) are needed. Nevertheless, our present work highlights a novel way to address flower longevity and presents future opportunities to control senescence delay in cut flowers.

Material and Methods

Treatment of cut flowers with NOP-1 peptide. Cut flowers of carnations (*Dianthus caryophyllus*) and rose (*Rosa hybrida*), graded for marketable quality, were obtained from a local flower producer. Upon arrival in the laboratory, the cut flower stems were re-cut to a length of approximately 23 cm. Flowers were treated with NOP-1 by adding the peptide dissolved in 50 mM Tris/Acetic acid pH 8 at a final concentration of 500 μ M directly to the vase reservoir. Cut carnations placed in 50 mM Tris/Acetic acid pH 8 were used as mock control. Flowers with 1 mM of senescence inhibitor AgNO₃ added to the buffer served as positive control. Six flowers were used for each treatment to evaluate vase life throughout the experiment. Progression of senescence was recorded photographically for a period of 15 days. Images were acquired using fixed camera setting and set-up to ensure high data quality and reliability. Changes in petal size and color were quantified using ImageJ (32bit v1.51t.). Relative discoloration of petals was quantified by drawing multiple lines across each flower (petals only) and calculating the average values for red (R), green (G) and blue (B). Data shown represent the values for blue as these showed the most significant difference between fresh and senescent flowers. Relative size of flowers was quantified using a macro that specifically recognizes the flower (petals + sepals) but not the flower stem with flower size in pixel² as the output. All Data are normalized to the maximum.

Uptake experiments with fluorescently labelled NOP-1. Carnations were watered with 1 mM Dansylamide-labeled NOP-1 or tap water only, respectively. Dansylamide fluorescence was imaged after 3 days using a Zeiss LSM780 confocal microscope (Dansylamide: λ_{ex} 405 nm, λ_{em} 500-550 nm; auto fluorescence: λ_{ex} 488 nm, λ_{em} 510-650 nm). To estimate NOP-1 uptake 500 mg petals of treated and untreated carnations (triplicates) were homogenized in 500 μ l water 3 days after treatment. Samples were centrifuged at 14.100 x g for 30 min. The resulting clear cell lysate was diluted 1:100 and absorbance (250 nm – 400 nm) was recorded using a DU800 spectrophotometer (Beckman Coulter, Krefeld). Absorbance at 330 nm ($\lambda_{ex_{max}}$ of dansylamide) was divided by the absorbance at 280 nm (proteins). Based on these data the difference between treated and untreated carnation flowers was calculated. Data shown are normalized to the maximum.

Cloning of *Dianthus caryophyllus* ethylene receptor ETR1 into expression vector pET16b. According to the published sequence (Carnation DB: Dca62022.1), full length codon optimized cDNA sequence encoding *Dianthus caryophyllus* ethylene receptor DcETR1 was ordered at GenScript United States. Vector construction of pET16b vector (Novagen, Madison, WI, United States) was performed by Gibson Assembly. The final construct carries an ampicillin resistance gene, a deca-histidine tag and the target DNA sequence of DcETR1. For linearized vector amplification oligonucleotides 5'-GGATCCGGCTGCTAACAAAGC-3' as forward primer and 5'-ATGACGACCTTCGATATGGC-3' as reverse primer were used. The target gene was amplified using 5'-ATCGAAGGTCGTCATATGGAGAGCTGCAACTGCATC-3' as forward primer and 5'-TTAGCAGCCGGATCCTTACTTCGGCATCGGCTCAAA-3' as reverse primer. Fragments were fused to the final circular expression vector by adding Gibson Assembly Master Mix including an exonuclease, a DNA polymerase and a ligase. The sample was incubated at 50 °C for 10 min and at 40 °C for 60 min. The assembled plasmid was transformed into *E. coli* XL 1-blue cells and sequenced at SeqLab (Göttingen, Germany).

Expression of recombinant carnation ethylene receptor protein DcETR1 in *E. coli* strain C43 (DE3). For the expression of recombinant DcETR1 2YT medium [1.6 % (w/v) peptone, 1 % (w/v) yeast extract and 0.5 % (w/v) NaCl] added with 2% (v/v) ethanol and 100 µg/mL ampicillin was used. Expression plasmid pET16b_DcETR1 was transformed in *E. coli* strain C43 (DE3). Cells were grown at 30 °C to an OD₆₀₀=0.4. Temperature was reduced to 16 °C and expression of DcETR1 was induced by adding 0.5 mM IPTG at OD₆₀₀=0.6. The expression was stopped after 20 h and cells were harvested by centrifugation at 7000 × g and 4°C for 15 min.

Solubilization, purification and labeling of recombinant DcETR1 with AlexaFluor488-NHS. C43-cells containing expressed carnation ethylene receptor DcETR1 were resuspended in PBS with 20 % (w/v) glycerol, 1 mM (w/v) DTT and 0.002 % (w/v) PMSF (buffer P). Resuspended cells were broken using a Constants Cell Disruption System (Constant Systems, Daventry, United Kingdom) at 2.4 kbar and 4°C. The cell lysate was centrifuged at 14,000 × g and 4°C for 30 min. Afterwards the supernatant was centrifuged again at 40,000 × g and 4 °C for 30 min. The resulting

membrane pellet was resuspended in buffer P and centrifuged at $34,000 \times g$ and 4°C for 30 min. For solubilization the pellet was resuspended in 50 mM Tris/HCl pH 8, 200mM NaCl, 1.2% (w/v) FosCholine-16, 0.002% (w/v) PMSF (buffer S) and stirred for 1 h at 700 rpm and RT. Solubilized ethylene receptor protein DcETR1 was separated from membrane fragments by ultracentrifugation at $229,600 \times g$ and 4°C for 30 min. The resulting supernatant was applied to metal ion affinity chromatography. To this end, the protein solution was loaded on a 5 mL HisTrap FF column operated on a ÄKTApriime plus (both GE Healthcare Life Sciences) at 4°C previously equilibrated with 50 mM Tris/HCl pH 8, 200mM NaCl and 0.002% (w/v) PMSF (buffer A). The protein bound to the column was washed with 50 column volumes 50 mM Tris/HCl pH 8, 200 mM NaCl, 50 mM KCl, 20 mM MgCl_2 , 10 mM ATP and 0.002% (w/v) PMSF (buffer ATP). Then the column was washed with buffer A containing 50 mM imidazole and the protein was eluted in buffer A containing 250 mM imidazole. Purified DcETR1 was concentrated and buffer exchanged to 100 mM potassium phosphate, 300 mM NaCl, 0.015 % (w/v) FosCholine-16 and 0.002 % (w/v) PMSF (buffer M). For labeling DcETR1 was incubated with 2.5 fold concentration of AlexaFluor488-NHS for 30 min at RT. Buffer was changed again to 50 mM Tris/HCl pH 8, 300 mM NaCl, 5 % (w/v) glycerol, 0.015 % (w/v) FosCholine-16 and 0.002 % (w/v) PMSF (buffer L).

DcETR1 binding studies by Microscale Thermophoresis. Recombinant proteins DcETR1 and AtEIN2⁴⁷⁹⁻¹²⁹⁴ were expressed, purified and labeled as described in the supplementary Information (Figure S1) and in [29]. For binding studies DcETR1 and NOP-1 were dissolved in 100 mM potassium phosphate buffer, 300 mM NaCl_2 and 0.015 % (w/v) FosCholine16. DcETR1 labelled with Alexa488 was used at a concentration of 50 nM. NOP-1 was diluted in 100 mM potassium phosphate buffer, 300 mM NaCl_2 and 0.015 % (w/v) FosCholine16 from 100 μM to 3 nM. AtEIN2⁴⁷⁹⁻¹²⁹⁴ was diluted in 50 mM potassium phosphate (pH 7.8), 300 mM NaCl, 0.015 % (w/v) FosCholine16 from 1457.5 nM to 0.7 nM. Samples were loaded into premium glass capillaries and thermophoresis was measured using a Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies GmbH, München, Germany) with 50 % (NOP-1) or 60 % (AtEIN2) MST power. As negative control binding partners were chemically denatured using 2 % (v/w) SDS and 40 mM DTT in the buffer used in the assay. All measurements were run in triplicates.

Amino acid alignment of ethylene receptor 1. Amino acid sequences of 17 different species were aligned using CLC Sequence Viewer 8 (QIAGEN Bioinformatics, Hilden, Germany). Accession numbers of the sequences used are A0A2P6RRN0, A0A1J7HIG6, A0A2K3PFW0, Q9XH58, B6CUX7, A0A1U8BHB1, J9XY08, Q8GV14, A0A022RCX4, Q8W2M7, Q8SBD2, A0A1D1XH0, Q206Y9, A0A2I0A057, F6KPP8 and X2KXU7.

Data availability. The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Acknowledgements

We are grateful to the Center of Advanced Imaging (CAI) at the Heinrich Heine University Düsseldorf for providing access to the LSM780 and technical support during image acquisition. We also thank Dr. A. Minges and Dr. A. Hofmann for their critical reading of the manuscript. This work was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) – Projektnummer 267205415 – SFB 1208 (project B06 to GG).

Author contributions

G.G. conceived the project. G.G., C.H. and L.M. designed experiments. C.H., L.M. and A.C.A. performed experiments. G.G., C.H. and L.M. wrote the manuscript. All authors read and edited the manuscript prior to publication.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

References

1. Nichols, R., *Sites of ethylene production in the pollinated and unpollinated senescing carnation (Dianthus caryophyllus) inflorescence*. Planta, 1977. **135**(2): p. 155-9.
2. Reid, M.S. and M.J. Wu, *Ethylene and Flower Senescence*. Plant Growth Regulation, 1992. **11**(1): p. 37-43.
3. Veen, H. and S.C. van de Geijn, *Mobility and ionic form of silver as related to longevity of cut carnations*. Planta, 1978. **140**(1): p. 93-96.
4. Broun, R. and S. Mayak, *Aminooxyacetic acid as an inhibitor of ethylenesynthesis and senescence in carnation flowers*. Scientia Horticulturae, 1981. **15**(3): p. 277-282.
5. Harkema, H., E.J. Woltering, and J.G. Beekhuizen, *The role of amino-oxyacetic acid, Triton X-100 and kinetin as components of a pretreatment solution for carnations*. Acta Hortic, 1987. **216**: p. 263-271.
6. Serek, M. and A.S. Andersen, *AOA and BA Influence on Floral Development and Longevity of Potted 'Victory Parade' Miniature Rose*. HortScience, 1993. **28**(10): p. 1039-1040.
7. Son, K.C., I.K. Lee, and J.Y. Ko, *Method for rapid screening the inhibitive effect of ethylene biosynthetic enzymes and its application as cut carnation preservatives*. J Korean Soc Hortic Sci, 1994. **35**: p. 57-65.
8. Woltering, E.J. and H. Harkema, *Use of AOA to prevent emasculation-induced quality loss in cut flowers*. Proceedings of NIOC, 1994: p. 139-145.
9. Serek, M., E.C. Sisler, and M.S. Reid, *Effects of 1-MCP on the vase life and ethylene response of cut flowers*. Plant Growth Regulation, 1995a. **16**: p. 93-97.
10. McDaniel, B.K. and B.M. Binder, *ETHYLENE RECEPTOR1 (ETR1) Is Sufficient and has the Predominant Role in Mediating Inhibition of Ethylene Responses by Silver in Arabidopsis thaliana*. Journal of Biological Chemistry, 2012.
11. In, B.C., et al., *Morphological and molecular characterization of ethylene binding inhibition in carnations*. Postharvest Biology and Technology, 2013. **86**: p. 272-279.
12. Serek, M., et al., *Controlling ethylene responses in flowers at the receptor level*. Biotechnology Advances, 2006. **24**(4): p. 368-381.
13. Reid, M.S. and F.G. Çelikel, *Use of 1-Methylcyclopropene in Ornamentals: Carnations as a Model System for Understanding Mode of Action*. HortScience, 2008. **43**(1): p. 95-98.
14. Bovy AG, et al., *Heterologous expression of the Arabidopsis etr1-1 allele inhibits the senescence of carnation flowers*. . Molecular Breeding, 1999. **5**: p. 301-308.
15. Savin KW, et al., *Antisense ACC oxidase RNA delays carnation petal senescence*. HortScience, 1995. **30**: p. 970-972.
16. Naing, A.H., et al., *Characterization of the role of sodium nitroprusside (SNP) involved in long vase life of different carnation cultivars*. BMC Plant Biol, 2017. **17**(1): p. 149.
17. Borochoy, A. and W.R. Woodson, *Physiology and Biochemistry of Flower Petal Senescence*. Horticultural Reviews, 1989. **11**: p. 15-43.
18. Sisler, E.C., M.S. Reid, and S.F. Yang, *Effect of antagonists of ethylene action on binding of ethylene in cut carnations*. Plant Growth Regulation, 1986. **4**(3): p. 213-218.
19. Mor, Y. and M.S. Reid, *Isolated petals, a useful system for studying flower senescence*. ActaHortic., 1980. **113**: p. 19-26.
20. Chang, C., et al., *Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators*. Science, 1993. **262**(5133): p. 539-44.
21. Hua, J., et al., *Ethylene insensitivity conferred by Arabidopsis ERS gene*. Science, 1995. **269**(5231): p. 1712-4.

22. Hua, J. and E.M. Meyerowitz, *Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in Arabidopsis thaliana*. Cell, 1998. **94**(2): p. 261-71.
23. Sakai, H., et al., *ETR2 is an ETR1-like gene involved in ethylene signaling in Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(10): p. 5812-7.
24. Ju, C., et al., *CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(47): p. 19486-91.
25. Bisson, M.M. and G. Groth, *New paradigm in ethylene signaling: EIN2, the central regulator of the signaling pathway, interacts directly with the upstream receptors*. Plant Signal Behav, 2011. **6**(1): p. 164-6.
26. Qiao, H., et al., *Processing and Subcellular Trafficking of ER-Tethered EIN2 Control Response to Ethylene Gas*. Science, 2012. **338**(6105): p. 390-393.
27. Wen, X., et al., *Activation of ethylene signaling is mediated by nuclear translocation of the cleaved EIN2 carboxyl terminus*. Cell Research, 2012. **22**(11): p. 1613-1616.
28. Bisson, M.M. and G. Groth, *Targeting Plant Ethylene Responses by Controlling Essential Protein-Protein Interactions in the Ethylene Pathway*. Mol Plant, 2015. **8**(8): p. 1165-74.
29. Bisson, M.M., et al., *Peptides interfering with protein-protein interactions in the ethylene signaling pathway delay tomato fruit ripening*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 30634.
30. Serek, M., E.C. Sisler, and M.S. Reid, *1-methylcyclopropene, a novel gaseous inhibitor of ethylene action, improves the life of fruits, cut flowers and potted plants*. Acta Hort., 1995b. **394**: p. 337-346.
31. Rodríguez, F.I., et al., *A Copper Cofactor for the Ethylene Receptor ETR1 from Arabidopsis*. Science, 1999. **283**(5404): p. 996-998.
32. Classen, E. and G. Groth, *Cloning, expression and purification of orthologous membrane proteins: a general protocol for preparation of the histidine sensor kinase ETR1 from different species*. Molecular Membrane Biology, 2012. **29**(2): p. 26-35.
33. Bisson, M.M., et al., *EIN2, the central regulator of ethylene signalling, is localized at the ER membrane where it interacts with the ethylene receptor ETR1*. Biochem J, 2009. **424**(1): p. 1-6.
34. Milic, D., et al., *Recognition motif and mechanism of ripening inhibitory peptides in plant hormone receptor ETR1*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 3890.
35. Klee, H.J. and D.G. Clark, *Ethylene Signal Transduction in Fruits and Flowers*, in *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!*, P.J. Davies, Editor. 2010, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 377-398.

Supplemental Information

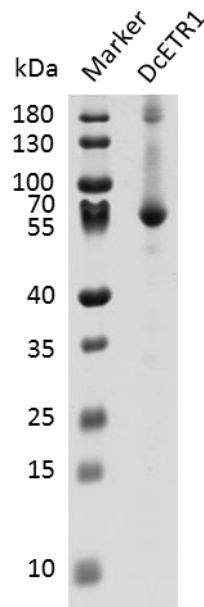


Figure S1 Heterologous expression and purification of carnation ethylene receptor DcETR1. DcETR1 was expressed in *E. coli* C43 (DE3) upon induction with 0.5 mM IPTG overnight at 16 °C and 180 rpm. Cells were harvested and stored until purification at -20 °C. Cells were lysed using a Cell Disruption System (CONSTANT SYSTEMS Ltd) and membrane fraction was collected by centrifugation at 40.000 x g. DcETR1 was solubilized by FosCholine 16 and purified by immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC). M: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). DcETR1: 1 µg of purified DcETR1 was loaded on a Tris-Tricine-SDS Polyacrylamide gel and electrophoretically separated for 1 h at 30 mA. The gel was stained using colloidal Coomassie G-250.

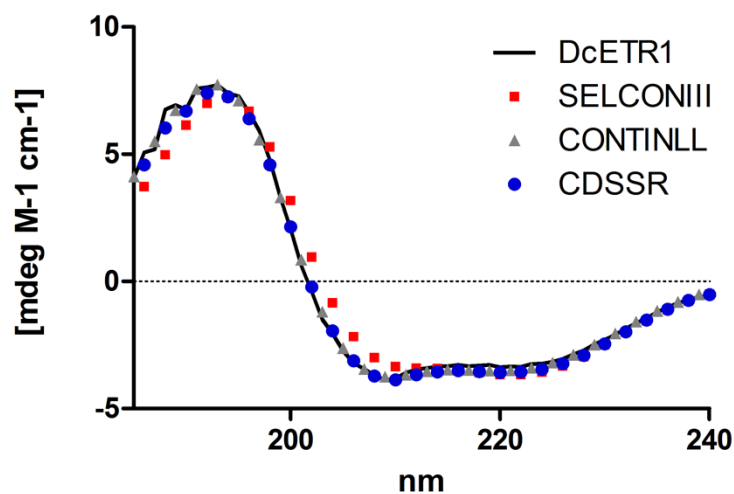


Figure S2 Circular dichroism (CD) spectrum of purified DcETR1. Far UV-CD scan of 0.2 mg/ml purified DcETR1 in 10 mM potassium phosphate pH 7 (black line) recorded at room temperature with a JASCO model J-715 spectropolarimeter (Jasco Corporation, Groß-Umstadt, Germany). The software package CDPro was used to calculate the amount of secondary structure elements (see also Table S1).

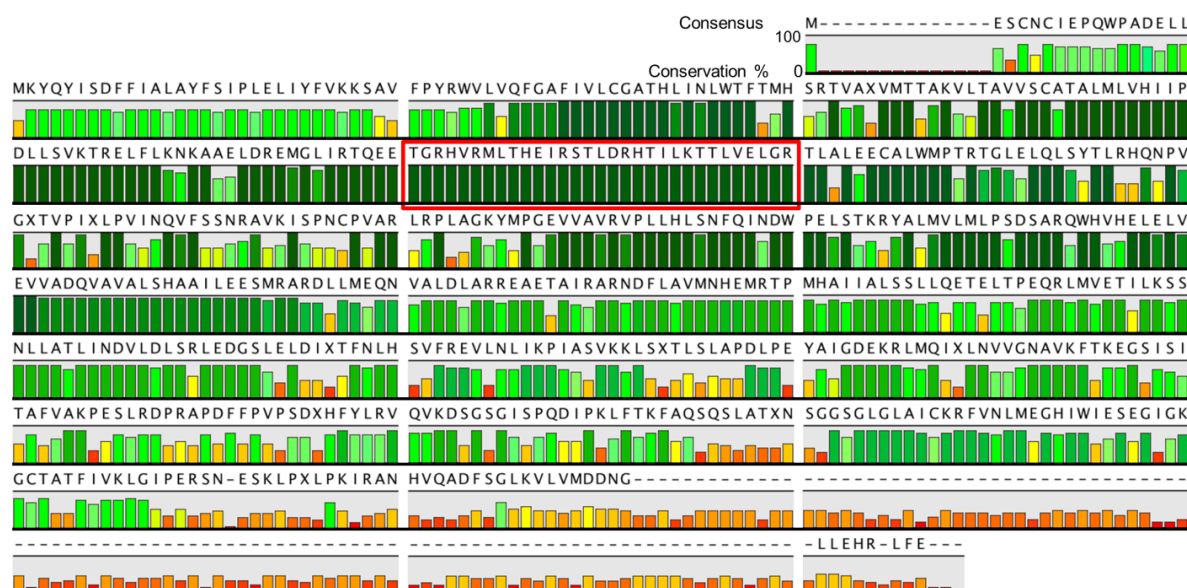


Figure S3 Conservation analysis from complete alignment of ETR1 homologs from 17 flowering ornamentals widely used as cut flowers. Colors show degree of conservation for each residue, dark green: 100 % conservation, dark red: 0 % conservation. The red box highlights the proposed binding site of the NOP-1 peptide in the GAF domain. For accession numbers see the Material and Methods section.

Table S1 Secondary structure content calculated by SELCONIII, ContinNL and CDSSR algorithms of CDPPro software package. Calculated structure elements are α -Helix $H(r)$; *distorted* Helix $H(d)$, β -Strand $S(r)$, *distorted* β -Strand $S(d)$, *Turn*, and *unordered* (*Unrd*).

Structure element	$H(r)$	$H(d)$	$S(r)$	$S(d)$	Turn	Unrd
SELCON3	24.7%	15.1%	8.7%	6.7%	19.3%	25.6%
CONTINLL	26.4%	16.0%	6.7%	5.8%	19.4%	25.7%
CDSSTR	26.9%	16.7%	8.2%	6.7%	18.5%	22.3%

5.2 Lösliche- und membranständige Proteine vermitteln den direkten Kupfertransfer auf Ethylenrezeptoren

Titel: Soluble and membrane-bound protein carrier mediate direct copper transport to the ethylene receptor family

Autoren: Claudia Hoppen, Lena Müller, Sebastian Hänsch, Buket Uzun, Dalibor Milić, Andreas J. Meyer, Stefanie Weidtkamp-Peters und Georg Groth

Eigener Anteil: 30%, Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente, Schreiben des Manuskripts

Veröffentlicht in: Scientific Reports 9, Artikelnummer 10715, Creative Commons Attribution 4.0 International License

DOI: 10.1038/s41598-019-47185-6, Juli 2019

Impact Factor 2018 (5 year): 4.525

Soluble and membrane-bound protein carrier mediate direct copper transport to the ethylene receptor family

Abstract

The plant hormone ethylene is a key regulator of plant growth, development and stress adaption. Ethylene perception and response are mediated by a family of integral membrane receptors (ETRs) localized at the ER-Golgi network. The biological function of these receptors relies on a protein-bound copper cofactor. Nonetheless, molecular processes and structures controlling assembly and integration of the metal into the functional plant hormone receptor are still unknown. Here, we have explored the molecular pathways of copper transfer from the plant cytosol to the ethylene receptor family by analyzing protein-protein interactions of receptors with soluble and membrane-bound plant copper carriers. Our results suggest that receptors primarily acquire their metal cofactor from copper transporter RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST-1 (RAN1) which has been loaded with the transition metal beforehand by soluble copper carriers of the ATX1-family. In addition, we found evidence for a direct interaction of ETRs with soluble chaperones ANTIOXIDANT-1 (ATX1) and COPPER TRANSPORT PROTEIN (CCH) raising the possibility of a direct copper exchange between soluble chaperones and receptors.

Introduction

Copper is an essential cofactor for many metalloproteins in all living organisms [1]. However, as the transition metal is toxic in the free monovalent form, copper homeostasis and delivery to the molecular targets in different cellular compartments is strictly controlled by specific protein carriers [2-4]. A main site for copper in plants controlling growth and development are the proteins of the ethylene receptor family [5, 6] which reside in the ER and Golgi membrane [7-10]. Naturally, this localization of the receptors requires the transport of monovalent copper from the plasma membrane via the cytoplasm to the apoproteins in the ER-Golgi membranes. The identity of the copper carriers involved in this task and their cellular routes are not yet completely known. Mutagenesis studies suggest that the metal cofactor is supplied by the P_{1B}-type ATPase RAN1 (HMA7) [11, 12] as reduced RAN1 function was shown to alter ligand specificity of the ethylene receptor family [11-13]. Addition of copper to the growth medium of mutant plants restored these defects highlighting the importance of effective copper delivery to the receptors. The ability of RAN1 to mediate biogenesis of functional receptors [13] favours direct interaction of the copper transfer ATPase with the receptors and suggests that both proteins are located - at least transiently - in the same subcellular compartment. However, to date neither their physical interaction nor the localization of RAN1 in the plant cell are known even though sequence homology with the mammalian Menkes/Wilson P-type copper ATPase suggests that RAN1 is localized at the Golgi membrane [14]. Other candidates for copper supply to the ethylene receptor family at the ER-Golgi network are the soluble copper chaperones of the ATX1 family (ATX1 and CCH) which showed direct interaction with RAN1 in yeast two-hybrid studies [15]. Several interactions between heavy metal transporting P-type ATPases (HMAs) and ATX1 chaperones have been reported for various species [16-18] and recent studies also confirmed direct interaction between RAN1 and ATX1 in higher plants at the endomembrane system [15, 19, 20].

In summary, the observations made so far lead to the hypothesis that copper is transferred from cytosolic ATX1 to RAN1 at the ER-Golgi and further transferred within these membranes to the ethylene receptor family. But in fact, the molecular processes and precise mechanism of copper transfer and copper assembly in the ethylene receptors are largely unknown and information on the biogenesis of the functional metallo-form of the receptors is sparse.

Results and Discussion

In this study, we analyzed the copper carriers ATX1, CCH and RAN1 for their interactions with the ethylene receptor ETR1 to explore the molecular pathways of copper transfer to the ethylene receptor family. Initially, we determined subcellular localization and topology of RAN1 in plant cells which had been inferred based on homology with other eukaryotic P-type HMAs, but have not been *resolved experimentally yet* [19]. Non-plant HMAs have been shown to shuttle between the plasma membrane and the *trans*-Golgi network depending on copper(I) availability as the mammalian Menkes and Wilson protein, or are presumed to act in the late or *post*-Golgi network as the yeast homologue *ccc2* [21, 22]. To resolve this issue for RAN1 we applied an inducible system for transient expression in *N. benthamiana* [23], allowing low expression levels of a fluorescently marked protein of interest in living cells. Notably, we identified clear colocalization of RAN1 with an ER marker (figure 1B) raising the possibility of physical interaction of the RAN1 copper transporter with the ER localized ethylene receptor family. Localization of RAN1 at the ER membrane was observed for different time points post induction excluding any impact of the expression level on localization (figure S1A). In contrast, no colocalization was found when RAN1-mVenus was coexpressed with a mCherry-tagged Golgi marker protein (figure 1A), although certain vesicle-like structures of RAN1-mVenus were detected at these conditions. However, these structures do not colocalize with the Golgi marker (figure 1A, lower panel). Finally, subcellular localization of soluble copper chaperones ATX1 and the plant specific homologue CCH were probed (figure S1). Both proteins show no colocalization neither with the ER- nor the Golgi marker. Instead, the diffuse appearance of the mVenus-tagged copper chaperones observed in confocal microscopy supports a cytosolic localization of these proteins.

Next, we studied the membrane topology of RAN1 at the ER membrane. HMAs share a similar overall structure and topology consisting of typically six or eight transmembrane helices, the membrane-external actuator domain (A domain) and the ATP-binding domain (ATP domain), and for most of them N- and occasionally C-terminal extensions containing ATX1-like metal-binding domains [24]. RAN1 is predicted to contain six to ten transmembrane domains (TMDs) and a long N-terminal extension. Different bioinformatic algorithms, however, predict different orientations of the N-terminus relative to the membrane (ARAMEMNON, [25]) raising the question for the exact localization of the N-terminus.

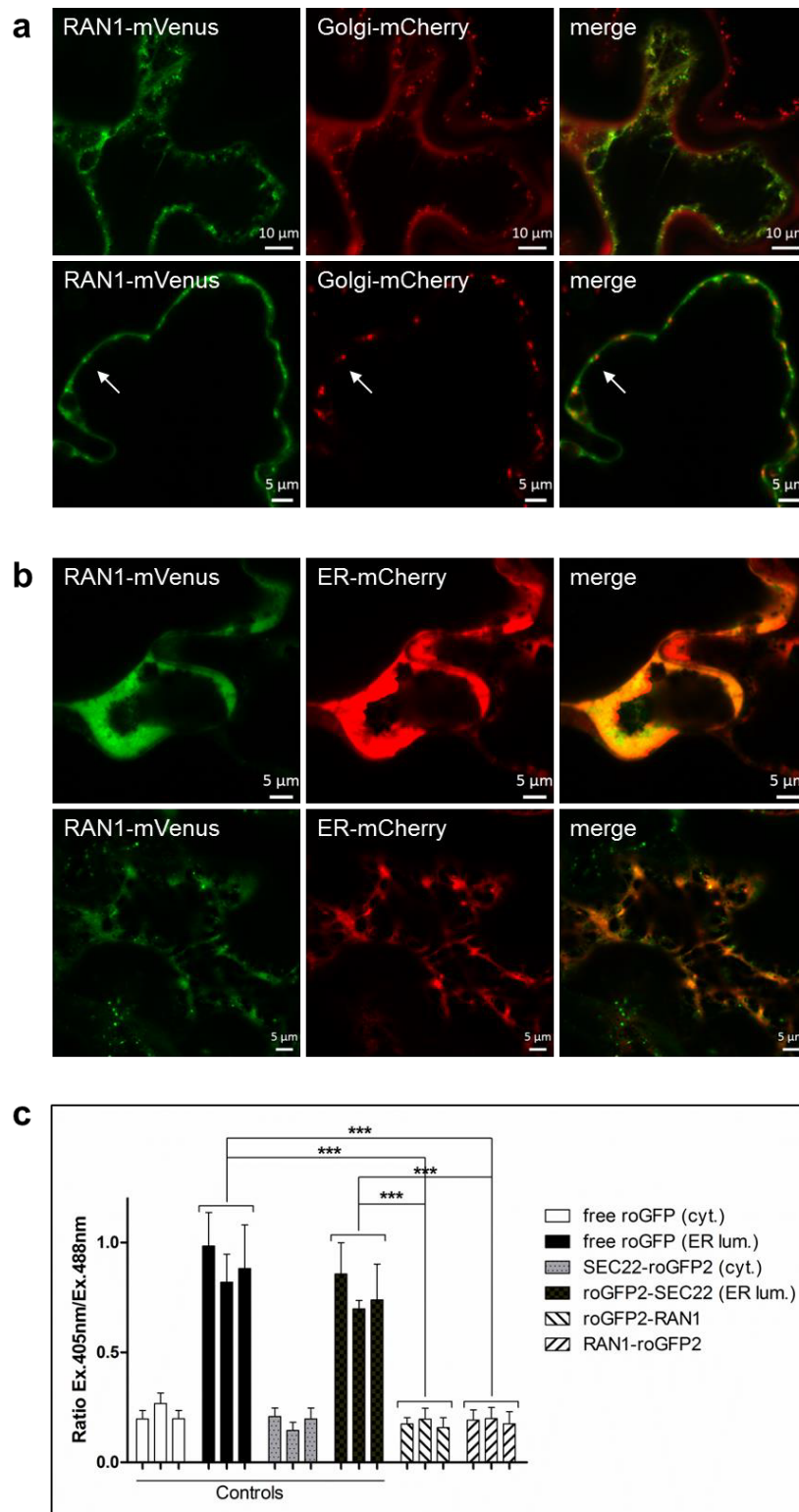


Figure 1 Subcellular Localization and Membrane Topology of RAN1 in planta A) Coexpression of RAN1-mVenus with a Golgi-mCherry marker show no clear colocalization of both proteins. Indicated by arrow are vesicle-like structures observed. Note, that these do not colocalize with the Golgi marker. B) Co-localization of RAN1-mVenus with an ER-mCherry marker demonstrates that RAN1 is localized mainly at the ER membrane. C) roGFP2 studies addressing the redox state of N- or C-terminally tagged fusions of RAN1 reveal that both termini are exposed to the cytosolic side of the ER membrane. Free roGFP2 targeted to either the ER or the cytosol together with N- or C-terminally tagged fusions of SEC22, a single membrane spanning protein, were used for internal control of RAN1 termini localization. Data shown represent three individual infiltrations per construct and ratios were calculated from 10 images per infiltration. Asterisks indicate significance level ($p \leq 0.0003$) determined using Student's t-test. Between RAN1-fusions and cytosolic control construct no significant difference could be detected ($p > 0.5$).

To further address this question, we made use of the redox-based topology assay (ReTa) [26]. In this assay, the redox-sensitive probe roGFP2 is fused to either the N- or the C-terminus of an ER-resident membrane protein of interest. After transient expression in tobacco leaves the fused probe self-indicates the orientation of the protein due to the steep redox gradient across the ER membrane with reducing conditions on the cytosolic face of the membrane and oxidizing conditions in the lumen. Studies of various RAN1-roGFP2 reporter constructs which are summarized in figure 1C revealed that both termini localize to the cytosolic side of the ER membrane indicating that the protein has an even number of TMDs.

To test for *in vivo* interaction of ethylene receptors, RAN1 and copper chaperones of the ATX1-family at the ER we used bimolecular fluorescence complementation (BiFC). First, we studied the interaction of RAN1 with soluble copper chaperones ATX1 and CCH in this set-up (figure 2A, B, upper panel, figure S2). Here, we used the RAN1/ATX1 BiFC pair as positive control in our set-up to demonstrate correct protein expression as interaction of both copper proteins has clearly been shown in previous studies [15, 19]. Notably, the ATX1-like chaperone CCH which differs from all known ATX1 homologues by a C-terminal extension (~45 amino acids), showed fluorescence complementation, similar to RAN1 and ATX1 in our experiments. Hence, based on these data we conclude that both soluble copper chaperones of the ATX1-family present in higher plants are able to interact with RAN1 although previous yeast-two-hybrid (Y2H) studies failed to demonstrate physical interaction of CCH with the plasma membrane localized P-type HMA *AtHMA5* or with RAN1, respectively [15, 27]. Receptor-like protein CLAVATA2 (CLV2) localizing to the ER and glutathione-S-transferase (GST) localizing in the cytosol were used as negative controls to ensure that the observed YFP emission result from fluorescence complementation of a specific interaction, but not from nonspecific self-assembly induced by the overexpression of the candidate interactors. No detectable YFP fluorescence emission was observed when RAN1, ATX1 or CCH (figure S3) were tested with the CLV2 or GST control verifying the specificity and biological relevance of the observed RAN1-ATX1 and RAN1-CCH interactions.

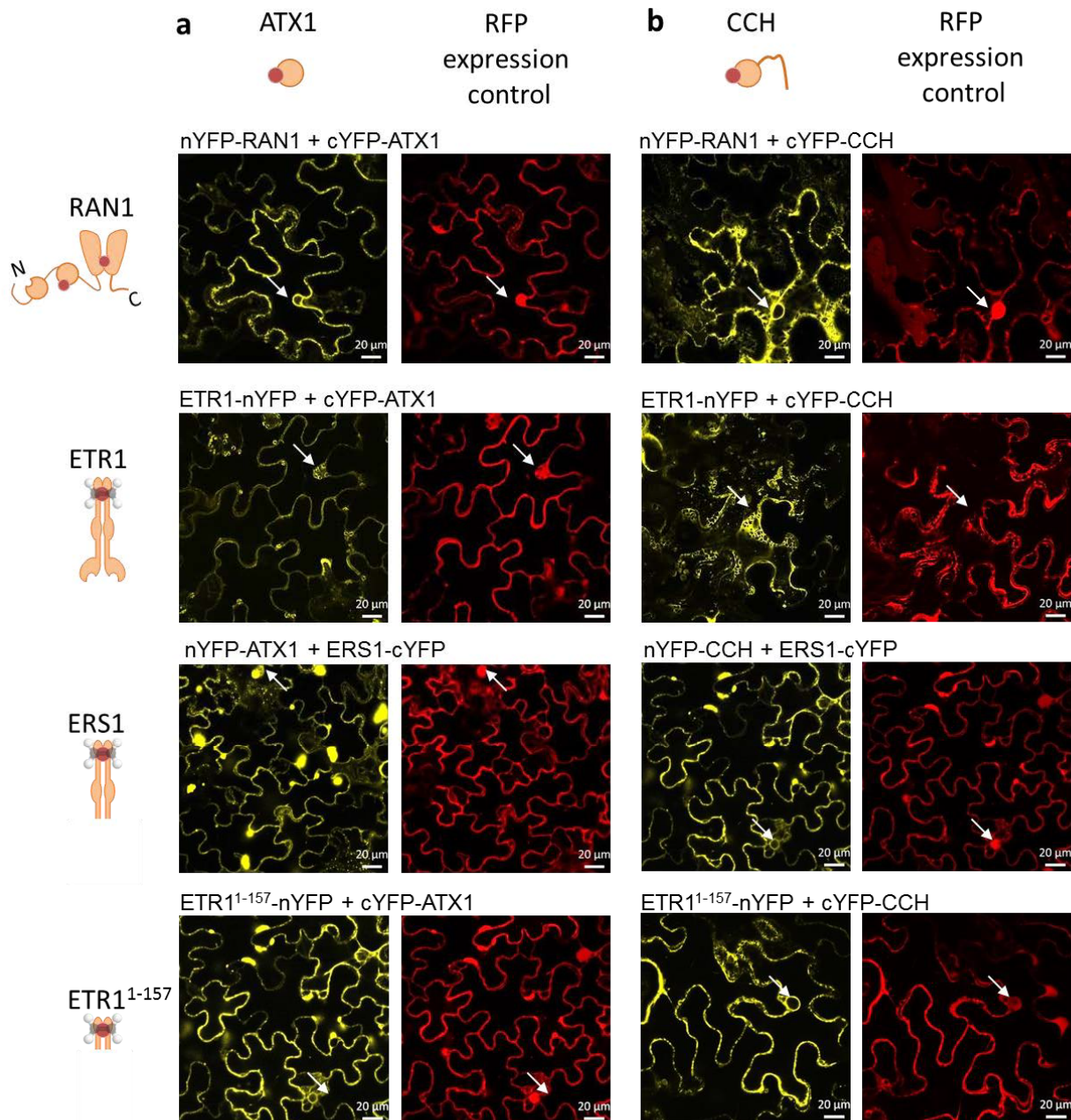


Figure 2 In planta Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) studies on the interaction of RAN1 or type-I ethylene receptors ETR1/ERS1 with soluble copper chaperones ATX1 and CCH. BiFC studies reveal protein interaction of RAN1 and ATX1 (A). Fluorescence complementation was also detected for RAN1 and CCH (B) indicating that both soluble chaperones of the ATX1-family interact with RAN1 in vivo. BiFC studies on the interaction of soluble copper chaperones ATX1 and CCH with type-I ethylene receptor ETR1 and ERS1 indicate a direct protein interaction of receptors with soluble copper chaperones. RFP expression acts as an infiltration control for the BiFC vector and is constitutively expressed (d35S). Constructs containing full-length ETR1 were under control of an inducible promoter, whilst constructs containing ERS1 and ETR1¹⁻¹⁵⁷ were constitutively expressed (d35S). Arrows indicate the meshed like structure or nucleus envelope staining, typical for the ER, visible only for the complementation signal (YFP) but not for free RFP. nYFP and cYFP symbolize the YFP fragment fused either N- or C-terminal to the protein of interest.

To further clarify copper transfer on the receptors, fluorescence complementation of RAN1 and type-I ethylene receptors ETR1 and ERS1 was analyzed (figure 3, figure S2). Indeed, fluorescence complementation was detected with both receptor isoforms indicating physical interaction with RAN1 at the ER membrane. Direct interaction of RAN1 and receptors has not been considered an essential element of copper transfer yet as previous studies have shown that yeast copper transporter Ccc2 is able to restore ethylene-binding affinity in genetically engineered *Saccharomyces cerevisiae* expressing ETR1 [13]. Based on the results of our topology studies we tested different truncations of RAN1 to pinpoint the domains interacting in the receptors and the copper transporter. The mutant consisting of the large cytosolic N-terminal region only was named NterRAN1 (amino acids 1-298), whereas the construct lacking this ATX1-like domain was termed CterRAN1 (amino acids 299-1001). Additionally, a construct consisting only of the transmembrane sensor domain with the putative copper(I) binding site of ETR1, ETR1¹⁻¹⁵⁷, was tested. Complementation with ETR1, ERS1 or truncated ETR1¹⁻¹⁵⁷ was observed only with full-length RAN1 and the NterRAN1 domain, but not with the CterRAN1 truncation indicating that the N-terminal region is directly involved in the interaction. Hence, copper transfer by RAN1 on the receptors is probably catalyzed by the membrane-external ATX1-like domain of the metal transporter. In addition complementation with ETR1¹⁻¹⁵⁷ indicates that the transmembrane part is sufficient to mediate interaction. As for the BiFC studies with RAN1 and soluble chaperones of the ATX1 family, ETR1, ETR1¹⁻¹⁵⁷ or ERS1 showed no YFP emission due to nonspecific self-assembly of the fluorophore as demonstrated in studies with the CLV2 or GST negative control (figure S3). Additionally, the subcellular localization of ETR1 truncated version ETR1¹⁻¹⁵⁷ was checked by coexpression with ER- and Golgi marker proteins. ETR1¹⁻¹⁵⁷ predominantly remains localized at ER membrane (figure S4).

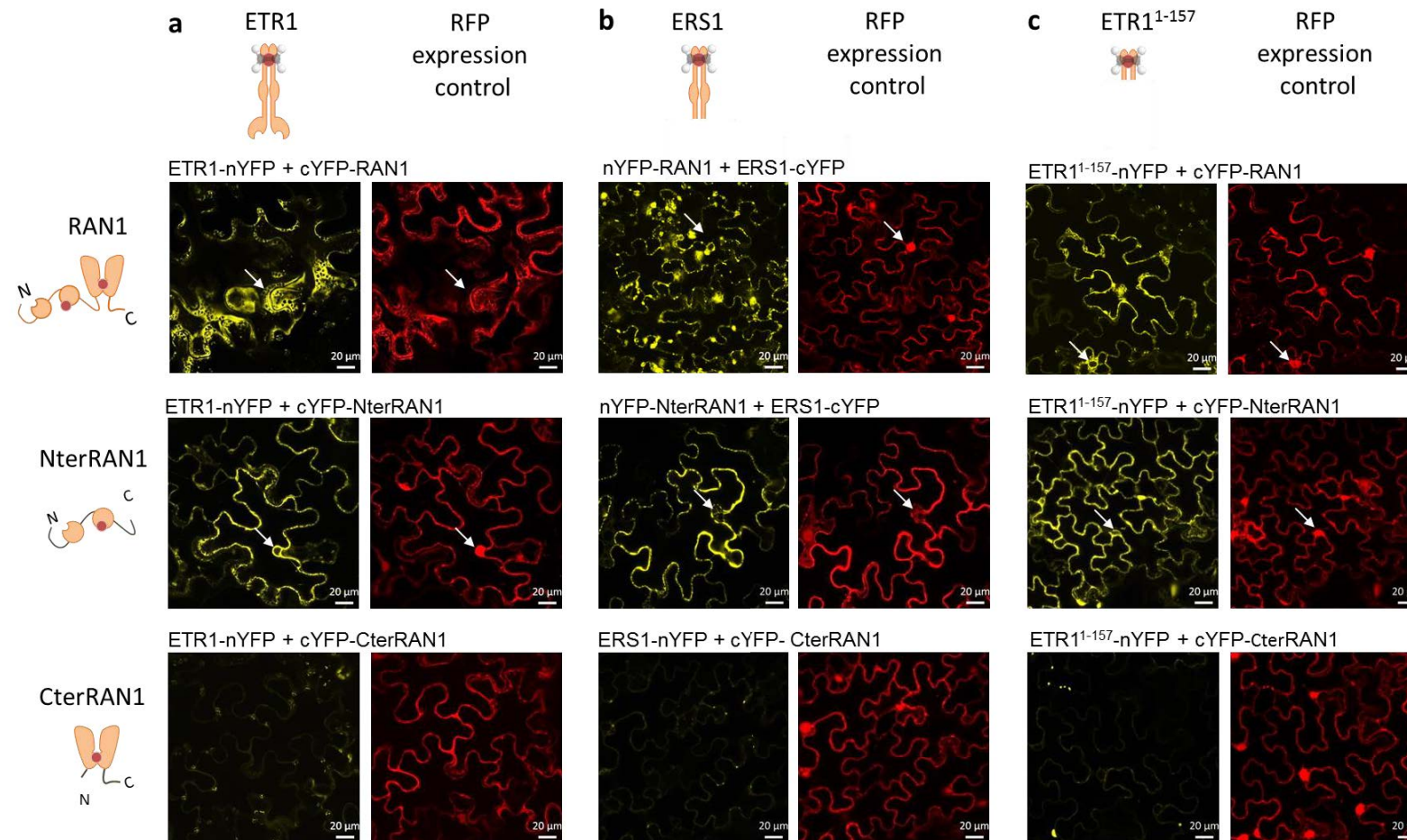


Figure 3 In planta Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) studies on the interaction of RAN1 with type-I ethylene receptors ETR1 and ERS1. BiFC studies on RAN1 and deletion mutants reveal an in vivo interaction of RAN1 with receptors ETR1 (A) and ERS1 (B). Complementation is observed for full-length RAN1 and NterRAN1 but not for CterRAN1 indicating that the large N-terminal region of RAN1 mediates the interaction. Additionally, deletion mutant ETR1¹⁻¹⁵⁷ (C) was tested which also interacts with RAN1 and NterRAN1 demonstrating that the transmembrane part of the receptor seems to be sufficient for interaction. RFP expression acts as an infiltration control for the BiFC vector and is constitutively expressed (d35S). Constructs containing full-length ETR1 were under control of an inducible promoter whilst constructs containing ERS1 and ETR1¹⁻¹⁵⁷ were constitutively expressed (d35S). Arrows indicate the meshed like structure or nucleus envelope staining, typical for the ER, visible only for the complementation signal (YFP) but not for free RFP. nYFP and cYFP symbolize the YFP fragment fused either N- or C-terminal to the protein of interest.

We next asked whether soluble chaperones of the ATX1 family can directly interact with the ethylene receptor family. Remarkably, fluorescence complementation was detected for type-I receptors ETR1 and ERS1 with both soluble copper chaperones, ATX1 and CCH (figure 2A, B lower panels, figure S2). These results point on a new - so far unknown - route for intracellular copper transfer on the receptors. To confirm this interaction and to resolve the domains in the interacting proteins in further experiments we used the ETR1¹⁻¹⁵⁷ truncation. Also in this case, fluorescence complementation was observed indicating that the transmembrane part of the receptor is sufficient for the interaction with the soluble copper chaperones of the ATX1 family (for further evidence on the contribution of the transmembrane part see in vitro interaction studies). Taken together these studies suggest that soluble ATX1-like chaperons are able to transfer their copper load from the cytoplasm to RAN1 at the ER membrane which subsequently transfers the metal ion to the receptors at the same membrane. However, soluble chaperones may also bypass RAN1 and directly interact with the ethylene receptors at the ER membrane. Copper binding at ETR1 independent of RAN1 has already been shown in previous studies in genetically engineered yeast [13]. Mutants expressing ETR1 but lacking the RAN1 homolog Ccc2p show no ethylene binding activity. However, addition of copper sulfate at 300 μ M concentration was able to restore ethylene binding activity in these mutants indicating that other copper carrier may provide the metal for the receptors as monovalent copper due to its cytotoxicity cannot exist in its free form in living organism.

To further explore the copper transfer network to the receptors, binding affinities of purified copper proteins were determined by *microscale thermophoresis* (MST). In addition to ATX1, RAN1 and receptor ETR1 a deletion mutant of the soluble copper chaperone CCH, CCH Δ , lacking the C-terminal extension was purified and used for protein interaction studies. All proteins were cloned from *Arabidopsis*, expressed in *E. coli* and purified to homogeneity from the bacterial host (figure S6A). Functional folding and activity of recombinant proteins were verified by copper(I) binding and/or ATPase activity assays (figure S6B, C). *In vitro* binding studies of RAN1 with ATX1 or CCH revealed similar affinities (figure 4A, figure S5A) of the copper transporter for both soluble chaperones with apparent dissociation constant of 41 ± 11 nM (ATX1) and 55 ± 13 nM (CCH). These data are in accordance to our previous BiFC analysis emphasizing that both types of chaperones are able to interact with RAN1 at similar affinities. Further binding studies using the CCH Δ deletion mutant show that the C-terminal region is not crucial for

the interaction with RAN1 as indicated by a dissociation constant ($K_D = 77 \pm 24$ nM) similar to full-length CCH. Additional studies on RAN1 deletion mutants with purified ATX1, CCH and CCH Δ show that the purified chaperons of the ATX1 family interact with both, NterRAN1 and CterRAN1, with similar dissociation constants ranging from 160 to 396 nM (figure 4A, figure S5A). Consequently, besides transfer at the N-terminal ATX1-like domain direct copper transfer to the transmembrane transport site in RAN1 seems possible as reported for the *Archaeoglobus fulgidus* copper chaperone CopZ and ATPase CopA [28].

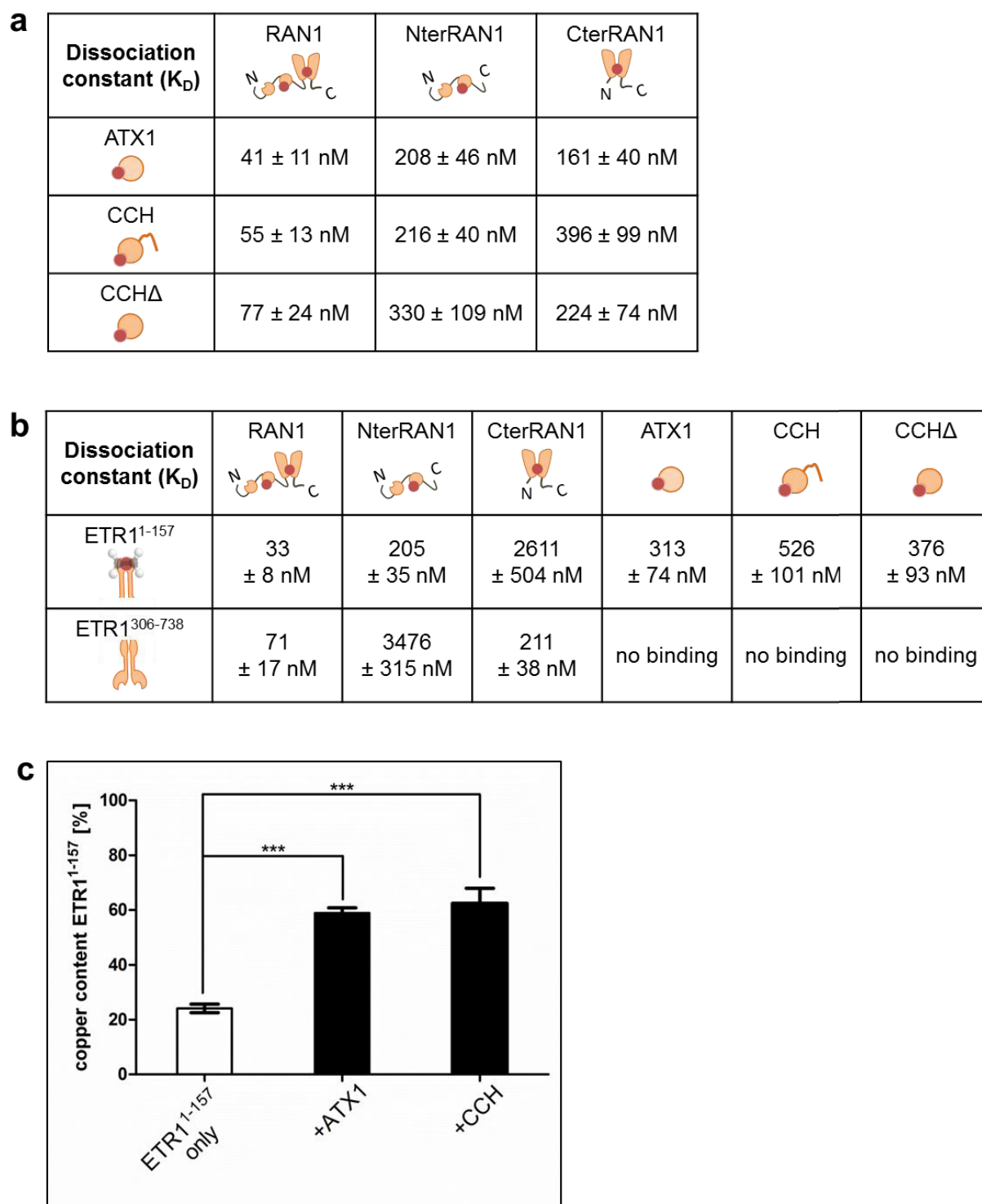


Figure 4 *In vitro* binding studies on RAN1, ETR1 and soluble copper chaperones by microscale thermophoresis (MST). A) Dissociation constants of RAN1 and RAN1 truncation mutants with soluble copper chaperones ATX1, CCH and CCHΔ, respectively. B) Dissociation constants of ETR1¹⁻¹⁵⁷ and ETR1³⁰⁶⁻⁷³⁸ with copper carriers RAN1, NterRAN1, CterRAN1, ATX1, CCH or CCHΔ, respectively. ETR1 interacts with both, the ATX-like chaperones and RAN1. Noteworthy, affinity of ETR1 for soluble copper chaperones is 10fold lower than observed for ETR1 with full-length RAN1. For detailed binding curves see figure S3. C) Copper transfer assay with purified recombinant Cu(I)-ATX1 or Cu(I)-CCH and ETR1¹⁻¹⁵⁷. Copper content of ETR1¹⁻¹⁵⁷ before (ETR1¹⁻¹⁵⁷ only) and after (+ATX1, +CCH) incubation with preloaded donor copper chaperone. Increase in copper loading after chaperone incubation indicates chaperone mediated copper transfer to ETR1. Asterisks indicate significance level ($p \leq 0.001$) determined using Student's t-test.

To substantiate our BiFC studies indicating a direct interaction of the copper transport ATPase RAN1 and ethylene receptors at the ER membrane, MST measurements were performed on purified recombinant proteins which confirmed a specific, high affinity interaction of ETR1¹⁻¹⁵⁷ with full-length RAN1 ($K_D = 33 \pm 8$ nM, figure 4B, figure S5C). To further identify the RAN1 domain interacting with the transmembrane copper binding domain in the receptor, truncation mutants NterRAN1 and CterRAN1 were analyzed. In these studies, a dissociation constant of 205 ± 35 nM was obtained for the interaction of ETR1¹⁻¹⁵⁷ with NterRAN1. In contrast, a 10-fold higher K_D of 2611 ± 504 nM was found when ETR1¹⁻¹⁵⁷ was tested with the CterRAN1 mutant representing the transmembrane copper transport site of the HMA. Together, these data suggest that the interaction between RAN1 and ETR1 is mediated mainly by the N-terminal ATX1-like domain of RAN1. To test whether the soluble extra-membranous part of ETR1 also contributes to the interaction of both proteins, we initiated binding studies of full-length RAN1, CterRAN1 and NterRAN1 with ETR1³⁰⁶⁻⁷³⁸ (figure 4 and S5). In these studies, we observed clear interaction of full-length RAN1 and ETR1³⁰⁶⁻⁷³⁸ with an affinity constant of 71 ± 17 nM suggesting that the extra-membranous part of ETR1 provides additional interaction sites and stabilizes the ETR1-RAN1 complex. In contrast to studies with ETR1¹⁻¹⁵⁷, NterRAN1 showed only weak affinity for ETR1³⁰⁶⁻⁷³⁸ ($K_D = 3476 \pm 315$ nM) while CterRAN1 still provides high affinity interaction to ETR1³⁰⁶⁻⁷³⁸ ($K_D = 211 \pm 38$ nM). Based upon these studies, we conclude that the RAN1-ETR1 interaction is mediated by both, binding of the N-terminal part of RAN1 to the transmembrane region of ETR1 and binding of the extra-membranous part of ETR1 to the C-terminal region of RAN1.

To further elaborate the role of the soluble metal carrier in copper transport to the receptors, binding studies were performed with purified ETR1 and chaperones ATX1, CCH or CCHΔ (figure 4B, figure S3B), respectively. In these studies, ETR1 shows similar affinities for ATX1 and CCHΔ with apparent dissociation constants of 313 ± 74 nM (ATX1) and 376 ± 93 nM (CCHΔ). In contrast, the CCH wildtype has a lower binding affinity on ETR1 ($K_D = 526 \pm 101$ nM) indicating that the C-terminal extension partially shields the interaction site. Nonetheless, all three soluble copper chaperones show clear interaction with ethylene receptor ETR1 *in vivo* and *in vitro* supporting copper exchange from the cytosolic copper chaperones to the ethylene receptors at the ER. No binding of soluble copper chaperones was observed with the extra-membranous part of the receptor (ETR1³⁰⁶⁻⁷³⁸) indicating that the interaction of receptors and soluble chaperones is

entirely mediated by the transmembrane part, i.e. this part of the receptor is necessary and sufficient for the interaction (figure 4 and S5). With that in mind, the observed approximately 10-fold higher affinity of ATX1-like chaperones for ETR1 compared to RAN1 (see respective K_D 's in figure 4 and S5) may result from the additional binding of RAN1 with the extra-membranous part of the receptor.

The studies presented so far provide compelling evidence for the interaction of soluble and membrane-bound copper carrier and ETRs. Based on the biological function of the copper carrier these interactions imply that the transition metal is transferred from the copper carrier to the cofactor binding site at the receptor. To demonstrate such chaperone-mediated copper transfer, soluble copper chaperones ATX1 and CCH were preloaded with the transition metal. The copper-loaded chaperones Cu(I)-ATX1 and Cu(I)-CCH then served as donors of the transition metal and were incubated with purified ETR1. Copper loading of receptors analyzed prior and after chaperone interaction shows clear differences (figure 4C) and reveals that the transition metal can be transferred between soluble chaperones of the ATX1 family and ETR1 in the receptor–chaperone complex.

Our *in vivo* and *in vitro* studies indicate that receptors may acquire their essential copper cofactor on two routes, a RAN1-dependent pathway and a RAN1-independent pathway (figure 5). Observed binding affinities imply that the gradual transfer from ATX1 to RAN1 ($K_D = 41 \text{ nM} \pm 11 \text{ nM}$) further to ETR1 ($K_D = 33 \text{ nM} \pm 8 \text{ nM}$) is the primarily route. Binding studies on truncation mutants stress that the N-terminal ATX1-like domain of RAN1 plays a central role in this process. Noteworthy, the direct transfer of the metal ion from soluble ATX1-like chaperones in the cytosol ($K_D \geq 313 \pm 74 \text{ nM}$) may represent an alternative copper route to the receptors. This route is supported by *in vivo* BiFC data and *in vitro* MST measurements. The 10-fold higher dissociation constant detected for the interaction of chaperones and receptors may indicate that this route is less favored and active only at certain physiological or developmental conditions. In this context, the expression pattern of ATX1 and RAN1 in *Arabidopsis* shoots support a complementary role of both proteins at high and low copper level (i.e. in the presence of copper chelator BCS) [29]. At high copper level when RAN1 expression is downregulated [29], direct interaction with ATX1 may ensure copper supply to the ethylene receptor family. Intriguingly, transcript levels of CCH are regulated converse to the expression of ATX1 but similar to RAN1 indicating a coherent regulation for RAN1 and CCH and the necessity for an “backup” copper route to the receptors [29].

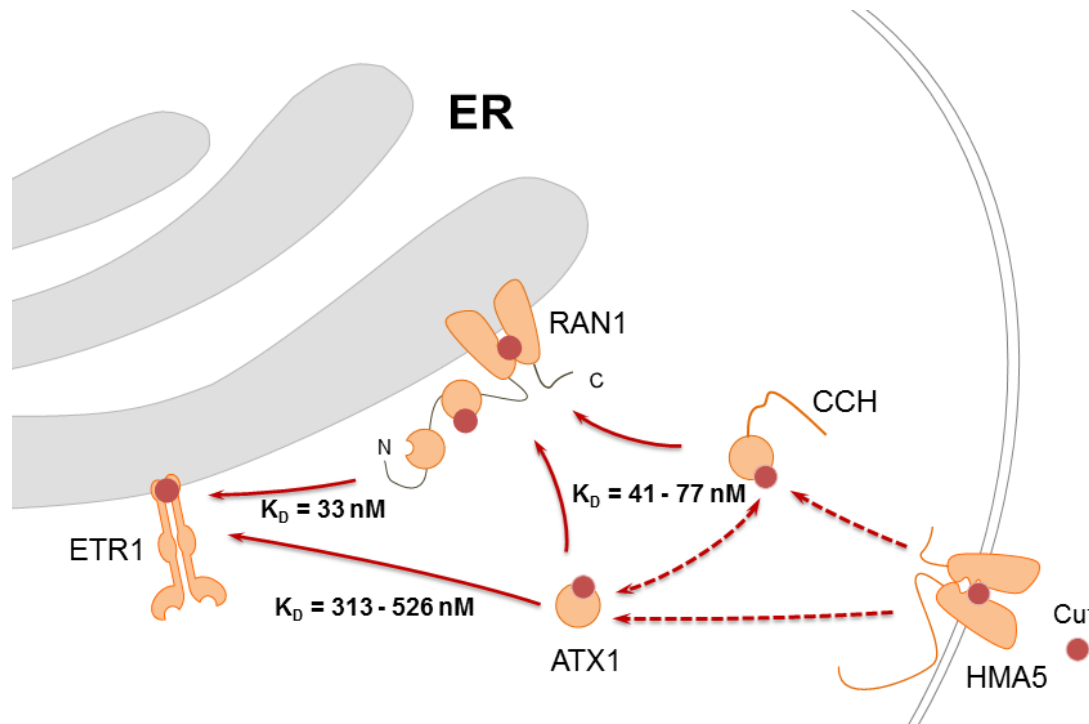


Figure 5 Proposed copper transport pathway of the transition metal to the ethylene receptor. Copper(I) is imported into the cell by HMA5. Two possible routes then deliver the monovalent cation to the ER localized receptors. The first route requires stepwise transfer of copper ions from soluble chaperones ATX1 or CCH to RAN1 followed by a transfer of the transition metal from RAN1 onto ETR1. The low dissociations constants determined for the related protein interactions suggest that this pathway is the major route. However, based on their *in vivo* and *in vitro* interaction a second alternative route of direct transfer of the metal cofactor from the soluble copper chaperones ATX1 or CCH to the receptors is also existing. Solid arrows correspond to interactions analyzed in this study; dashed arrows indicate interactions presumed from previous publications.

Summary

Copper delivery in plants needs to be tightly controlled to avoid toxic effects of the highly reactive transition metal. Nevertheless, several proteins have been described that require copper in its monovalent form for functionality. In addition to plastocyanin and superoxide dismutase, ER/Golgi localized ethylene receptors are a major group of plant copper proteins. In summary, our studies evince the full path from the cytosolic ATX1 chaperone family to RAN1 and the ethylene receptors at the ER membrane. Moreover, they pinpoint the protein domains interacting in this copper cascade and for the first time indicate direct copper exchange between the cytosolic chaperones of the ATX1-family and the ethylene receptor family. However, further studies are necessary to resolve molecular structures and dynamics of the copper routes to the receptors and to substantiate the biological relevance of the ATX1/CCH-ETR interactions.

Methods

Cloning Entry vectors for Gateway cloning were generated using the pENTR/D-TOPO Cloning Kit (Invitrogen) or via BP reaction of PCR products and pDONR221 vectors. Vectors for expression in *N. benthamiana* were generated by LR reaction of entry vectors (TOPO or pDONR221) and desired destination vectors (pAB [30] or pBiFC-2in1 [31]). For expression of full-length ETR1, an inducible BiFC vector, pBiFC-ind-CN, was cloned by combining features of pAB and pBiFC-2in1. For subcellular localization studies an inducible expression system was used [23]. BiFC [31] and roGFP2 [26] studies were performed using d35-driven constitutive expression of the gene of interest. Constructs for heterologous expression of full-length and deletion mutants in *E. coli* were integrated by Gibson assembly [32] into pETEV16b.

Agroinfiltration and expression in *N. benthamiana* Transformation and infiltration were performed as previously described [33]. Confocal laser scanning microscopy was performed using a Zeiss LSM780 laser scanning microscope in cooperation with the *Center for advanced imaging* (Cai) at Heinrich-Heine University Düsseldorf. mVenus fluorescence was excited at 488 nm (Laser intensity: 1.8 – 6 %, emission: 503 -556 nm), while mCherry fluorescence was excited at 561 nm (Laser intensity: 2.2 – 4 %, emission: 570 – 624 nm). Pinhole was always adjusted to 1 Airy unit (AU). In addition, the chloroplast autofluorescence was detected in a separate detector between 625 nm and 735 nm in the same track as the mCherry signal.

Ratiometric analyses of RAN1 topology Gateway destination vectors, control constructs for roGFP, cloning of fusion constructs and agroinfiltration of 4-week-old *N. benthamiana* plants were performed as described in [26]. Ratiometric confocal imaging was done on a Zeiss LSM780 laser scanning microscope. roGFP fluorescence was excited at 405 nm and 488 nm. In total 30 images for each construct were collected (3 x 10, individual infiltrations) and used for ratio calculation. Image analyses was performed using ImageJ (32bit v1.51t.) and ratiometric data were obtained by dividing images collected upon excitation at 405 nm by images collected by excitation upon 488 nm. Only pixels with intensity levels of at least 4 times higher than the background were taken into account and saturated pixels were excluded.

Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) Gateway destinations vectors for the 2in1 cloning system and BiFC analyses were a kind gift from Dr. Christopher Grefen

(Ruhr-Universität Bochum). Imaging of BiFC constructs was performed on a Zeiss LSM780 laser scanning microscope. YFP fluorescence was excited at 488 nm (Laser Intensity: 4.2 – 7 %, Emission: 503 - 556 nm), while RFP fluorescence (infiltration marker) was excited at 561 nm (Laser Intensity: 2 %, Emission: 570 – 624 nm). Pinhole was always adjusted to 1 Airy unit (AU). In addition, the chloroplast autofluorescence was detected in a separate detector between 625 nm and 735 nm in the same track as the mCherry signal.

Heterologous expression in *E. coli* For expression of *Arabidopsis thaliana* ATX1, CCH, CCHΔ and NterRAN1, *E. coli* BL21 (DE3) or C43 (DE3) were transformed with pETEV16b-ATX1/CCH/CCHΔ/NterRAN1 or pETEV16b-RAN1/CterRAN1 and grown on 2YT-Agar plates (+Amp¹²⁰) overnight at 37 °C. 100 ml 2YT medium (+Amp¹²⁰) were inoculated and incubated overnight at 37 °C and 180 rpm. 5 ml were used to inoculate 500 ml 2YT medium (+Amp¹²⁰). Cultures were grown to an OD₆₀₀ of 0.5 and then cooled down to 16 °C. Expression was induced with 0.5 mM of IPTG when OD₆₀₀ reached 0.8. Cultures were incubated overnight at 16 °C and 180 rpm. After harvest, cells were shock frozen in liquid nitrogen and stored at -20 °C. Expression and purification of AtETR1¹⁻¹⁵⁷ was performed as described previously for tomato ethylene receptors LeETR4 and NR [34]. Cells expressing RAN1 and CterRAN1 were stored at -80 °C. ETR1³⁰⁶⁻⁷³⁸ was expressed in *E. coli* and cells were stored as described in [35].

Purification of recombinant proteins For purification of ATX1, CCH, CCHΔ, RAN1, NterRAN1, and CterRAN1 cells were resuspended in 5 ml/g of buffer A (50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 10 % (w/v) glycerol, 1 mM DTT, 0.002 % (w/v) PMSF, DNaseI, pH 7.0-8.2). Cells were lysed using a cell disruption system (Constant Systems Limited) and centrifuged for 1 h at 100 000 x g for soluble proteins or 40 000 x g for membrane collection. Membrane proteins were solubilized by adding 1 % (w/v) DDM and centrifuged at 230.000 x g after 1 h of gentle agitation. In both cases supernatants were loaded on a 5 ml HisTrap HP column, equilibrated with buffer A or buffer A + 0.1 % (w/v) DDM using an ÄKTAPrime plus system (GE Healthcare). After a washing step with buffer A + 100 mM Imidazole, proteins were eluted with buffer B (buffer A + 500 mM imidazole). Elution fractions were pooled, concentrated by ultracentrifugation using Amicon Ultra-15 tubes (Merck, Darmstadt) and buffer exchanged using PD 10 desalting columns (GE Healthcare) equilibrated with buffer A. The protein solutions were aliquoted to 500 µl, shock frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. Aliquots were thawed on ice and digested with 100 mg TEV protease for 1 h at room temperature or overnight at 4 °C to

cleave off the 10xHis-tag. 500 µl were then loaded on a Superdex200 10/300 GL size exclusion column, equilibrated with buffer SEC (50 mM HEPES, 300 mM NaCl, pH 7-8.2) or buffer SEC + 0.1 % (w/v) DDM. If necessary, elution fractions were concentrated. Successful purification, functionality and activity of the recombinant proteins were checked by SDS-PAGE, copper(I) binding ability and/or ATP hydrolysis (figure S6). ETR1³⁰⁶⁻⁷³⁸ was purified and stored as described in [35].

Labeling of purified proteins For interaction studies by microscale thermophoresis, recombinant proteins were labeled with AlexaFluor488-NHS (Life Technologie) prior the final purification step by size exclusion. To this, recombinant protein was incubated with 2.5 fold amount of AlexaFluor488-NHS for 1 h at room temperature followed by digestion with TEV protease. 500 µl of labeled protein solution was loaded on a Superdex200 10/300 GL size exclusion column to separate aggregates, TEV protease and free dye from the protein of interest in a single step. Elution fractions were pooled and directly used in MST measurements.

Microscale thermophoresis Binding studies of purified recombinant proteins were performed in triplicates using a Monolith NT 115 and premium capillaries (NanoTemper Technologies) with 60 % MST power and 60-70 % LED power. In these studies RAN1 and CterRAN1 were labeled as described above and diluted to a concentration of 15 nM in buffer SEC-R (50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 0.1% (w/v) DDM pH 7.5) and NterRAN1 was diluted to a concentration of 50 nM in buffer SEC (50 mM HEPES, 300 mM NaCl, pH 7.5) containing 0.05 % (w/v) Tween20. Dilution series of ATX1, CCH and CCHΔ from 30 µM to 0.9 nM were prepared in buffer SEC (50 mM HEPES, 300 mM NaCl, pH 7.5). For measurements ETR1¹⁻¹⁵⁷, RAN1 and CterRAN1 were labeled as described above and diluted to a concentration of 20 nM in buffer SEC-R (50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 0.1% (w/v) DDM pH 7.5). NterRAN1 was diluted to a concentration of 40 nM in buffer SEC (50 mM HEPES, 300 mM NaCl, pH 7.5) containing 0.05 % (w/v) Tween20. Dilution series of ETR1¹⁻¹⁵⁷ from 10 µM to 0.3 nM was prepared in buffer SEC (50 mM HEPES, 300 mM NaCl, pH 7.5) with 0.015 % (w/v) FosCholine-16. For measurements of ETR1¹⁻¹⁵⁷ and ATX1-like chaperones (ATX1, CCH and CCHΔ), soluble chaperones were labeled as described above and diluted to a concentration of 75 nM, 100 nM and 50 nM, respectively, in buffer SEC (50 mM HEPES, 300 mM NaCl, pH 7.5) with 0.015 % FosCholine-16, and 0.05 % Tween20. A serial dilution of ETR1¹⁻¹⁵⁷ from 7.5 µM to 0.2 nM was prepared in buffer SEC (50 mM HEPES, 300 mM NaCl, pH 7.5) containing 0.015 % (w/v) FosCholine-16 and 0.05 % (w/v)

Tween20. For measurements with ETR1³⁰⁶⁻⁷³⁸ a serial dilution from 37 μ M to 1.1 nM was prepared in buffer D (50 mM Tris, 250 mM NaCl, 0.015 % (w/v) FosCholine16, 2.5 mM DTT, 20 % (w/v) glycerol, cOmplete EDTA-free protease inhibitor cocktail, pH 8.5). Labeled RAN1, CterRAN1, NterRAN1, ATX1, CCH and CCH Δ were diluted to a final concentration of 50 nM in buffer D.

His-Tag cleavage and metal loading of copper chaperones Purified recombinant chaperones CCH and ATX1 were incubated over night with TEV protease in a 1:70 ratio at 4 °C to remove the 10x histidine tag. Processed chaperones were loaded with monovalent copper by incubation with the chromophoric BCA₂-Cu(I)-chelate complex for 5 min (see also figure S6) until solution stays purple. Separation of copper-loaded, His-tag free chaperones was performed by size exclusion chromatography using a Superdex200 10/300 GL column operated on an ÄKTAPrime plus (both GE Healthcare). Chaperones were concentrated to 400 μ M by ultrafiltration.

Copper transfer assays from chaperones to receptor To assess copper transfer from chaperones (ATX1 and CCH) to receptor (ETR1), 250 μ L of purified histidine-tagged ethylene receptor ETR1¹⁻¹⁵⁷ with a concentration of 200 μ M was bound to 150 mg Protino Ni-TED resin (Macherey-Nagel) equilibrated in 250 μ L buffer X (50 mM Tris/HCl pH 8, 200 mM NaCl, 0.015 % FosCholine-16) for 1 h at RT. Then, 250 μ L of 400 μ M purified fully copper-loaded chaperone was added and incubated together with resin-bound ETR1¹⁻¹⁵⁷ for 2 h at RT. Ni-TED material was spun down for 60 s at 14.000 rpm. The supernatant was collected and concentrated for further analysis. Steps were repeated for 30 min each at RT with 500 μ L buffer X containing 100 mM, 250 mM and 500 mM imidazole, respectively. Fractions were analyzed by western blotting and SDS-PAGE. Protein concentration was calculated based on the absorption at 280 nm. Copper concentration in fractions exclusively containing ETR1¹⁻¹⁵⁷ was determined after chemical and thermal denaturation of the samples using 20% SDS and heating to 95°C for 15 min. The copper released was re-complexed with 20 mM BCA and the amount of the chromophoric BCA₂-Cu(I) chelate complex formed in this assay detected spectrophotometrically at 562 nm. Percentage of copper loading was calculated from protein and copper concentrations determined.

Author contributions

G.G. conceived the project., C.H. and G.G. designed experiments. C.H., L.M., S.H., B.U., S.W.-P. and D.M. performed experiments. A.M. advised roGFP experiments. G.G. and C.H. wrote the manuscript. All authors read and edited the manuscript prior to publication.

Acknowledgements

We would like to acknowledge the Center of Advanced Imaging (CAI) at the Heinrich Heine University Düsseldorf for providing access to the LSM780 and technical support during image acquisition. This work was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) – Projektnummer 267205415 – SFB 1208 (project B06 to GG, project Z02 to SWP).

Competing interests

The authors declare no competing interests.

References

1. Festa, R.A. and D.J. Thiele, *Copper: an essential metal in biology*. Curr Biol, 2011. **21**(21): p. R877-83.
2. Lamb, A.L., et al., *Crystal structure of the copper chaperone for superoxide dismutase*. Nat Struct Biol, 1999. **6**(8): p. 724-9.
3. Lamb, A.L., et al., *Heterodimeric structure of superoxide dismutase in complex with its metallochaperone*. Nat Struct Biol, 2001. **8**(9): p. 751-5.
4. Portnoy, M.E., et al., *Structure-function analyses of the ATX1 metallochaperone*. J Biol Chem, 1999. **274**(21): p. 15041-5.
5. Burg, S.P. and E.A. Burg, *Molecular requirements for the biological activity of ethylene*. Plant Physiol, 1967. **42**(1): p. 144-52.
6. Rodriguez, F.I., et al., *A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from Arabidopsis*. Science, 1999. **283**(5404): p. 996-8.
7. Grefen, C., et al., *Subcellular localization and in vivo interactions of the Arabidopsis thaliana ethylene receptor family members*. Mol Plant, 2008. **1**(2): p. 308-20.
8. Dong, C.H., et al., *Molecular association of the Arabidopsis ETR1 ethylene receptor and a regulator of ethylene signaling, RTE1*. J Biol Chem, 2010. **285**(52): p. 40706-13.
9. Sisler, E.C., *Partial Purification of an Ethylene-binding Component from Plant Tissue*. Plant Physiol, 1980. **66**(3): p. 404-6.
10. Chen, Y.F., et al., *Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of Arabidopsis*. J Biol Chem, 2002. **277**(22): p. 19861-6.
11. Hirayama, T., et al., *RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in Arabidopsis*. Cell, 1999. **97**(3): p. 383-93.
12. Woeste, K.E. and J.J. Kieber, *A strong loss-of-function mutation in RAN1 results in constitutive activation of the ethylene response pathway as well as a rosette-lethal phenotype*. Plant Cell, 2000. **12**(3): p. 443-55.
13. Binder, B.M., F.I. Rodriguez, and A.B. Bleeker, *The copper transporter RAN1 is essential for biogenesis of ethylene receptors in Arabidopsis*. J Biol Chem, 2010. **285**(48): p. 37263-70.
14. Petris, M.J., et al., *Ligand-regulated transport of the Menkes copper P-type ATPase efflux pump from the Golgi apparatus to the plasma membrane: a novel mechanism of regulated trafficking*. EMBO J, 1996. **15**(22): p. 6084-95.
15. Puig, S., et al., *Higher plants possess two different types of ATX1-like copper chaperones*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **354**(2): p. 385-90.
16. Hamza, I., et al., *Interaction of the copper chaperone HAH1 with the Wilson disease protein is essential for copper homeostasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(23): p. 13363-8.
17. Lin, S.J., et al., *A role for the Saccharomyces cerevisiae ATX1 gene in copper trafficking and iron transport*. J Biol Chem, 1997. **272**(14): p. 9215-20.
18. Multhaup, G., et al., *Interaction of the CopZ copper chaperone with the CopA copper ATPase of Enterococcus hirae assessed by surface plasmon resonance*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **288**(1): p. 172-7.
19. Li, W., et al., *Triplin, a small molecule, reveals copper ion transport in ethylene signaling from ATX1 to RAN1*. PLoS Genet, 2017. **13**(4): p. e1006703.
20. Zhang, Y., et al., *OsATX1 Interacts with Heavy Metal P1B-Type ATPases and Affects Copper Transport and Distribution*. Plant Physiol, 2018. **178**(1): p. 329-344.

21. Dierick, H.A., et al., *Immunocytochemical localization of the Menkes copper transport protein (ATP7A) to the trans-Golgi network*. Hum Mol Genet, 1997. **6**(3): p. 409-16.
22. Yuan, D.S., A. Dancis, and R.D. Klausner, *Restriction of copper export in Saccharomyces cerevisiae to a late Golgi or post-Golgi compartment in the secretory pathway*. J Biol Chem, 1997. **272**(41): p. 25787-93.
23. Zuo, J., Q.W. Niu, and N.H. Chua, *Technical advance: An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants*. Plant J, 2000. **24**(2): p. 265-73.
24. Melchers, K., et al., *Membrane topology of CadA homologous P-type ATPase of Helicobacter pylori as determined by expression of phoA fusions in Escherichia coli and the positive inside rule*. Res Microbiol, 1999. **150**(8): p. 507-20.
25. Schwacke, R., et al., *ARAMEMNON, a novel database for Arabidopsis integral membrane proteins*. Plant Physiol, 2003. **131**(1): p. 16-26.
26. Brach, T., et al., *Non-invasive topology analysis of membrane proteins in the secretory pathway*. Plant J, 2009. **57**(3): p. 534-41.
27. Andres-Colas, N., et al., *The Arabidopsis heavy metal P-type ATPase HMA5 interacts with metallochaperones and functions in copper detoxification of roots*. Plant J, 2006. **45**(2): p. 225-36.
28. Gonzalez-Guerrero, M. and J.M. Arguello, *Mechanism of Cu⁺-transporting ATPases: soluble Cu⁺ chaperones directly transfer Cu⁺ to transmembrane transport sites*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(16): p. 5992-7.
29. del Pozo, T., V. Cambiazo, and M. Gonzalez, *Gene expression profiling analysis of copper homeostasis in Arabidopsis thaliana*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **393**(2): p. 248-52.
30. Bleckmann, A., et al., *Stem cell signaling in Arabidopsis requires CRN to localize CLV2 to the plasma membrane*. Plant Physiol, 2010. **152**(1): p. 166-76.
31. Grefen, C. and M.R. Blatt, *A 2in1 cloning system enables ratiometric bimolecular fluorescence complementation (rBiFC)*. Biotechniques, 2012. **53**(5): p. 311-14.
32. Gibson, D.G., et al., *Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases*. Nat Methods, 2009. **6**(5): p. 343-5.
33. Bisson, M.M., et al., *EIN2, the central regulator of ethylene signalling, is localized at the ER membrane where it interacts with the ethylene receptor ETR1*. Biochem J, 2009. **424**(1): p. 1-6.
34. Kessenbrock, M., et al., *Novel Protein-Protein Inhibitor Based Approach to Control Plant Ethylene Responses: Synthetic Peptides for Ripening Control*. Front Plant Sci, 2017. **8**: p. 1528.
35. Milic, D., et al., *Recognition motif and mechanism of ripening inhibitory peptides in plant hormone receptor ETR1*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 3890.

Supplementary Information

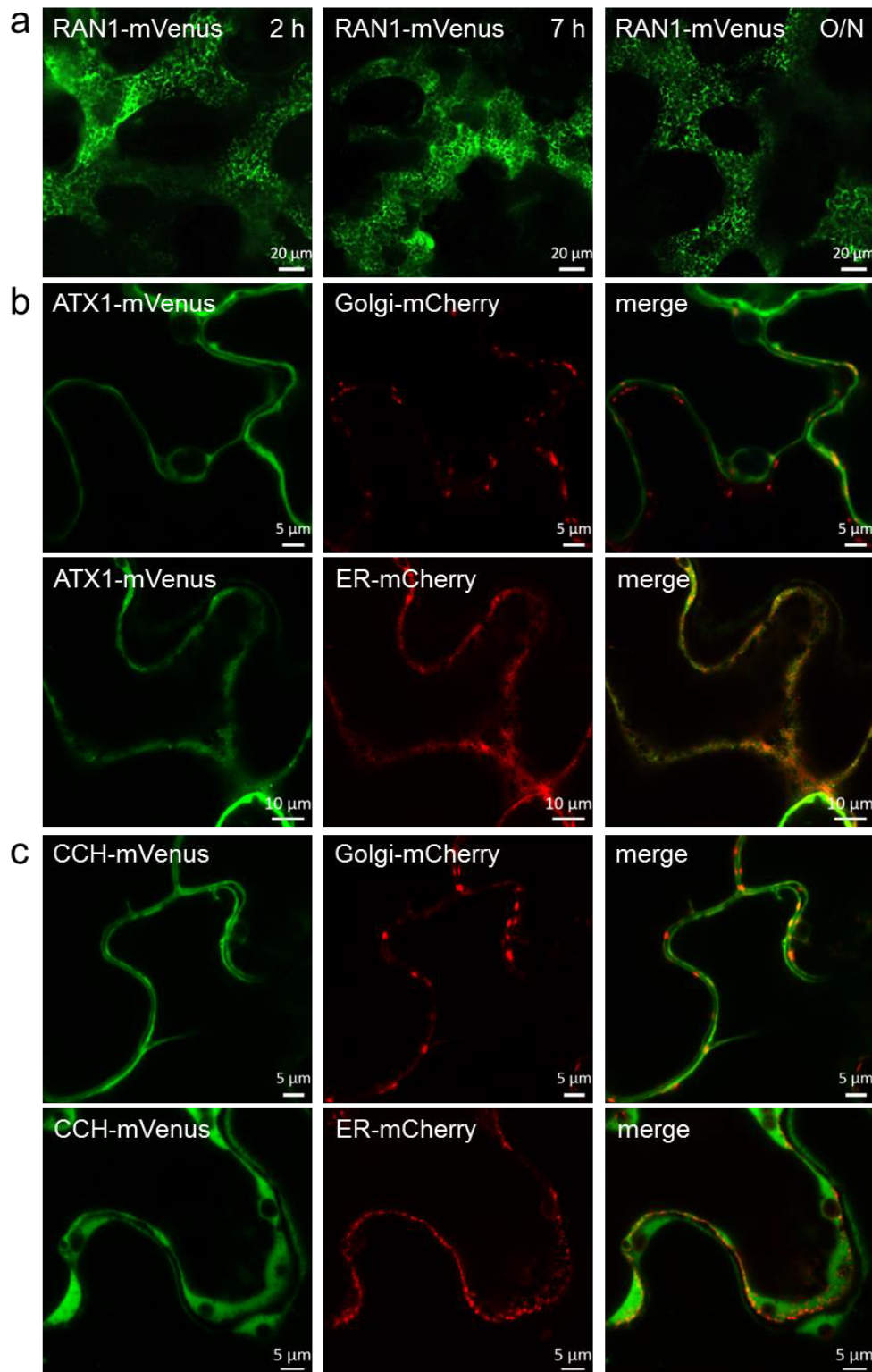


Figure S1: Subcellular localization studies on RAN1, ATX1 and CCH in *N. benthamiana* leaf cells. Related to figure 1. **A)** Coexpression of RAN1-mVenus with an ER-mCherry marker at different time points post induction. **B)** Coexpression of mVenus-tagged copper chaperone ATX1 with Golgi-mCherry and ER-mCherry marker. ATX1 shows no colocalization with any of the marker proteins supporting cytosolic localization of the chaperone characteristic for soluble copper chaperones. **C)** Coexpression of mVenus-tagged copper chaperone CCH with Golgi-mCherry and ER-mCherry marker. Similar to ATX1 the plant specific copper chaperone CCH shows no colocalization with any of the marker proteins supporting cytosolic localization of the chaperone characteristic for soluble copper chaperones.

a

	cYFP	RAN1	ATX1	CCH	ETR1	ETR1 ¹¹⁻¹⁵⁷	ERS1
nYFP							
RAN1			+	+	n.A.	n.A.	+
ATX1		+		n.A.	n.A.	n.A.	+
CCH		+	n.A.		n.A.	n.A.	+
ETR1		+	+	+		n.A.	n.A.
ETR1 ¹¹⁻¹⁵⁷		+	+	+	n.A.		n.A.
ERS1		+	+	+	n.A.	n.A.	

b

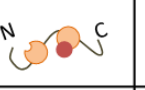
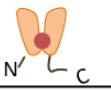
	cYFP	RAN1	NterRAN1	CterRAN1
nYFP				
ETR1		+	+	- (very weak)
ETR1 ¹¹⁻¹⁵⁷		+	+	- (very weak)
ERS1		+	+	- (very weak)

Figure S2: Summary of Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) studies, revealing interaction of ethylene receptors with both, soluble and membrane bound copper carriers. Related to figures 2 and 3. **A, B)** BiFC studies on the interaction of RAN1, ATX1-like copper chaperone and ethylene receptors. Proteins were fused either with fragment nYFP or cYFP as indicated. + indicates fluorescence complementation, - indicates very weak complementation most likely resulting from spontaneously assembled YFP as a result of stochastic proximity. n.a. construct not tested. The RAN1-ATX1 interaction represents a positive control as it is described in [1].

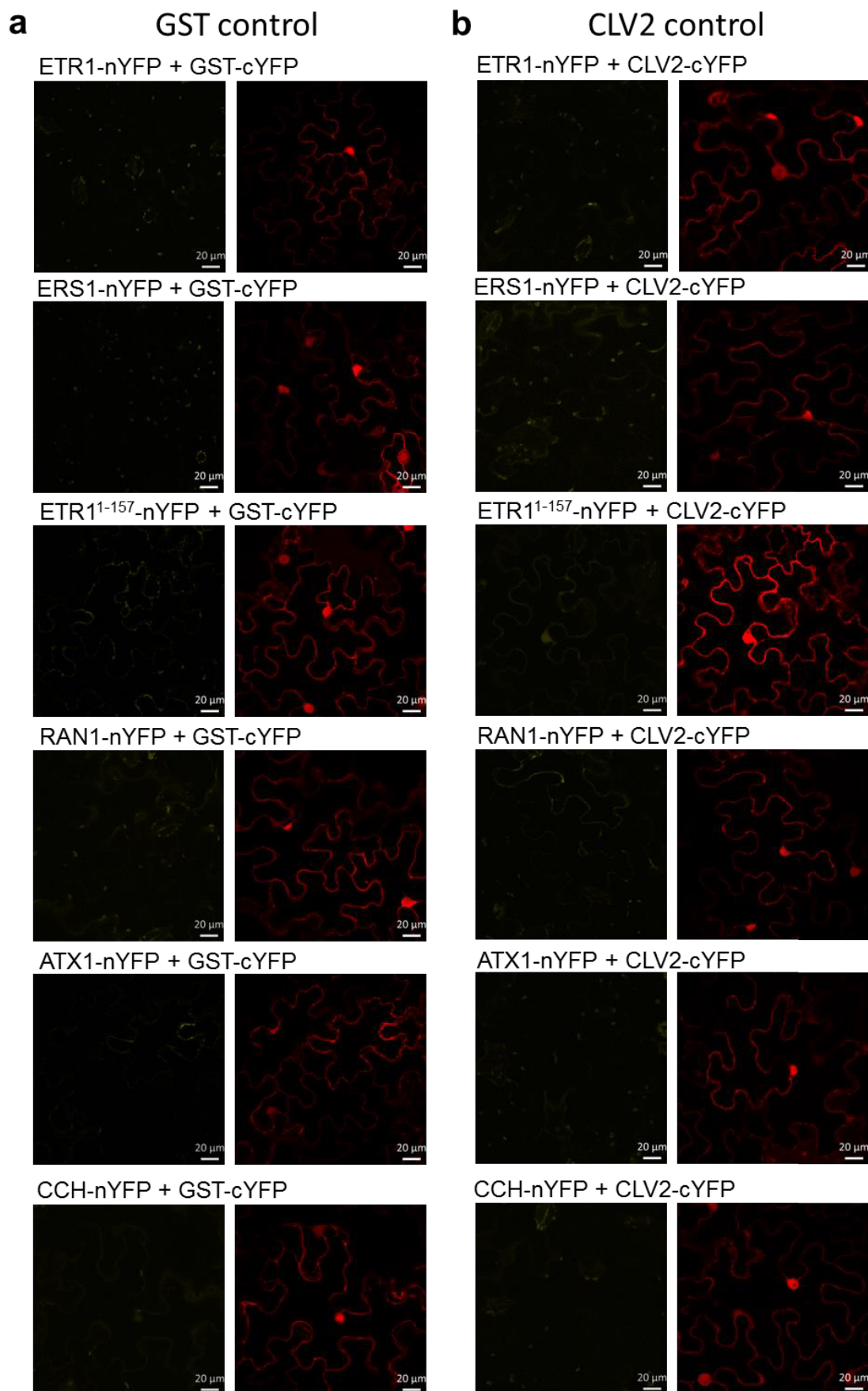


Figure S3 BiFC negative controls. Related to figures 2 and 3. nYFP-fusions of all proteins used in this study with cYFP-fusion of either cytosolic glutathione-S-transferase (GST, left panel) or the ER localized receptor-like protein CLAVATA2 (CLV2, right panel) were used in bimolecular fluorescence complementation assay. No YFP fluorescence emission was detected in any of the controls.

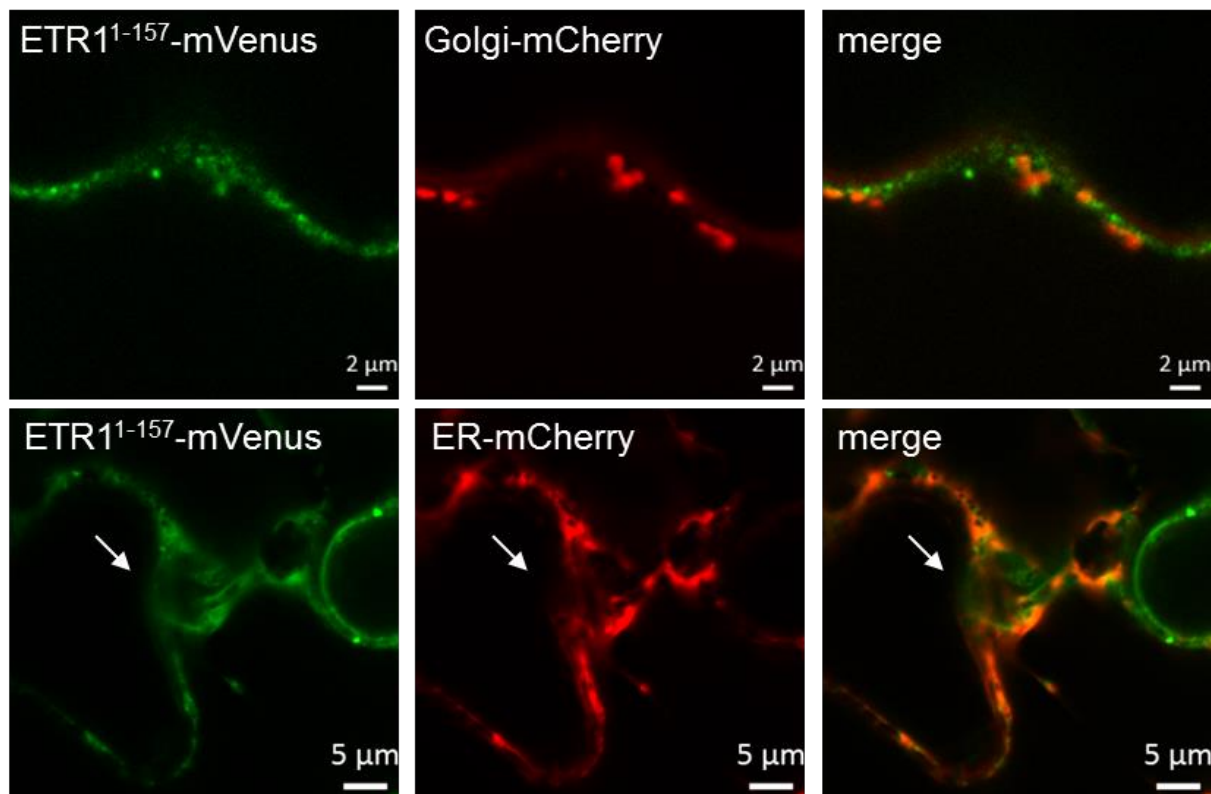


Figure S4: Subcellular localization of ETR1¹⁻¹⁵⁷ in *N. benthamiana* cells expressing ETR1-mVenus and Golgi-mCherry (upper pannel) or ER-mCherry (lower pannel). ETR1¹⁻¹⁵⁷ colocalizes partially with the ER-marker, but no clear colocalization with the Golgi-marker could be observed. Related to figures 2 and 3. In addition to colocalization with the ER marker ETR1¹⁻¹⁵⁷ localizes also to other membranous structures as indicated by the arrow.

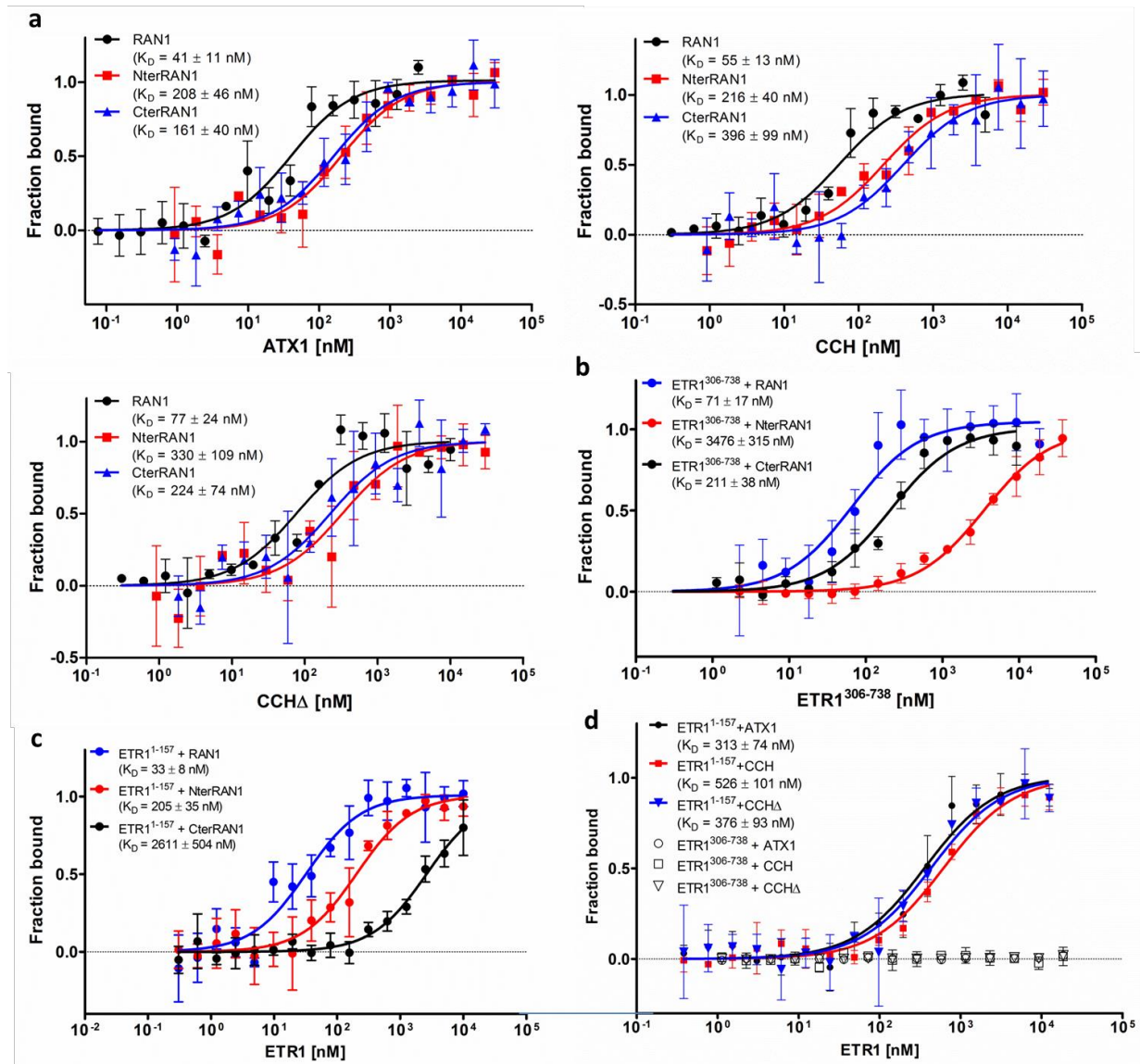


Figure S5: Quantitative binding studies of RAN1 and ATX1-like copper chaperones by Microscale thermophoresis. Related to figure 4. A) Binding studies between RAN1, the N-terminal domain of RAN1 (NterRAN1) and RAN1 lacking the N-terminal domain (CterRAN1) with soluble copper chaperones ATX1, CCH and CCH lacking the C-terminal extension (CCHΔ). The dissociation constants (K_D) determined in these studies indicate tight interaction between RAN1 and soluble copper chaperones ($K_D = 41 - 77$ nM). RAN1 truncation mutants show an approx. 4-times lower affinity, although still in the nM range (NterRAN: $K_D = 208 - 330$ nM, CterRAN1: $K_D = 161 - 396$ nM). Notably, deletion of the C-terminal extension of CCH results only in a slight decrease in affinity. This data suggest that soluble chaperones interact with the N-terminal ATX1-like domains as well as with the copper translocating region of RAN1. **B)** Binding studies with ETR1³⁰⁶⁻⁷³⁸ demonstrate interaction with RAN1 ($K_D = 71 \pm 17$ nM), NterRAN1 ($K_D = 3476 \pm 315$ nM) and CterRAN1 ($K_D = 211 \pm 38$ nM) indicating additional binding sites for the ETR1-RAN1 interaction between the extra-membranous part of the receptor and the C-terminal part of RAN1. **C)** Titration of ETR1¹⁻¹⁵⁷ with RAN1, NterRAN1 and CterRAN1 demonstrates the importance of the N-terminal ATX1-like motifs for tight interaction of ETR1 and RAN1. Full-length and NterRAN1 show affinities for ETR1¹⁻¹⁵⁷ in the nM range (RAN1: 33 ± 8 nM, NterRAN1 205 ± 35 nM). In contrast, dissociation constant K_D drops to the μ M range with CterRAN1 (2611 ± 504 nM). **D)** Titration of ETR1 with soluble copper chaperones demonstrates direct interaction of receptors and soluble chaperones in the upper nM-range (ATX1: 313 nM, CCHΔ: 376 nM). Data indicate that the C-terminal extension of CCH partially shields or destabilizes this interaction ($K_D = 526$ nM). In contrast to binding studies with RAN1, ETR1³⁰⁶⁻⁷³⁸ shows no binding to ATX1, CCH or CCHΔ indicating that the interaction of ETR1 with the soluble chaperones of the ATX1 family is determined by the transmembrane region of the receptor.

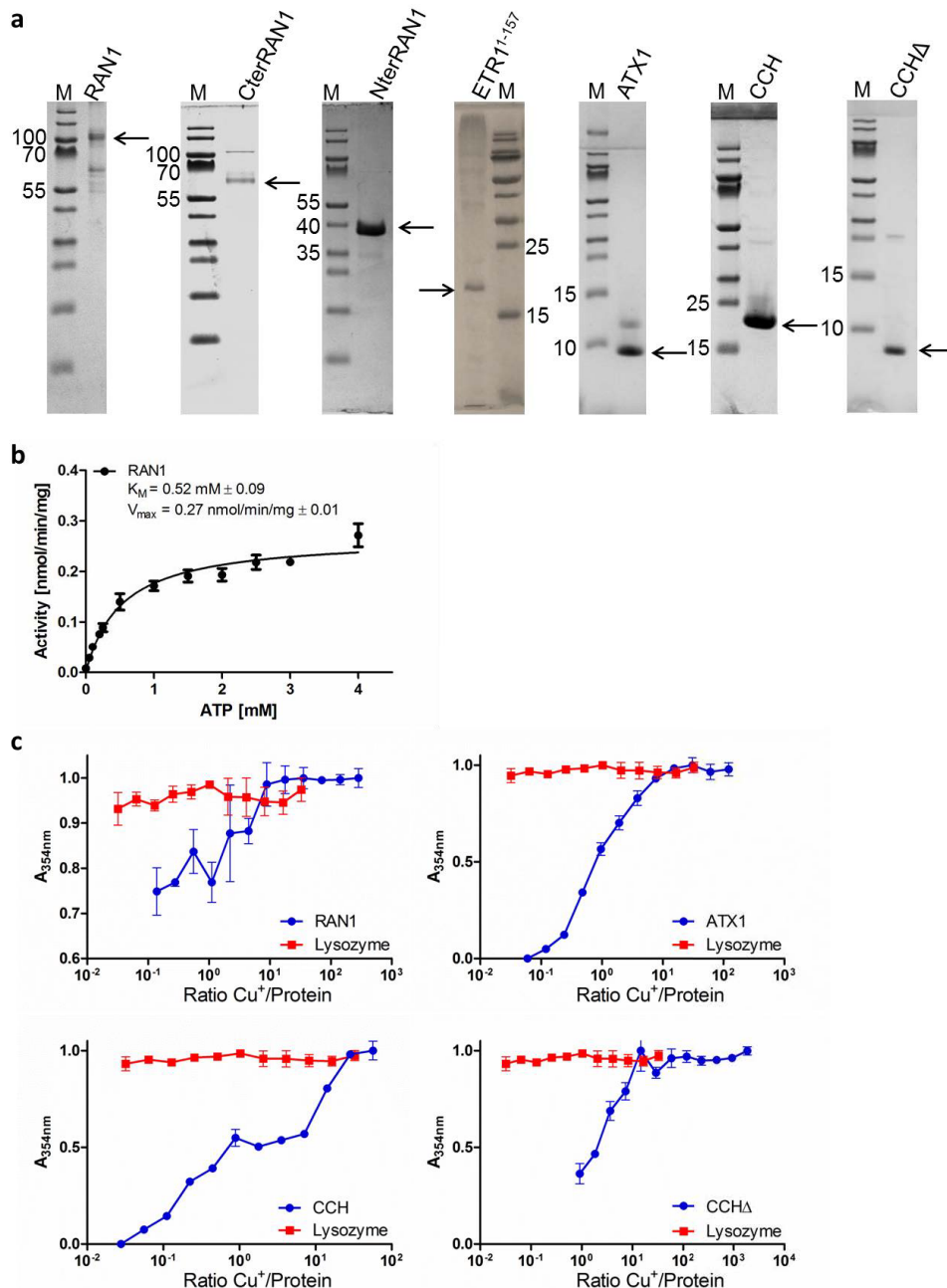


Figure S6: Heterologous expression and purification of RAN1, NterRAN1, CterRAN1, ETR1¹⁻¹⁵⁷, ATX1, CCH and CCHΔ. Related to figure 4 and Material and Methods: Purification of recombinant protein. **A)** SDS-PAGE of purified recombinant proteins; M: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). 1 μg of purified protein was loaded on Tris-Tricine gels and separated for 2.5 h at 30 mA. Gels were washed three times with hot water, afterwards proteins were stained overnight using colloidal Coomassie G-250. Image acquisition was performed using a BioDocAnalyzer System (Analytik Jena) with standard settings. Each gel slice originates from a different gel. Only lanes unrelated to this publication or empty were cropped. **B)** ATPase assay of RAN1 for quantification of ATP hydrolysis activity. 20 μl of RAN1 was stepwise diluted in 50 mM HEPES, 300 mM NaCl pH 7.5 and hydrolysis initiated by the addition of 5 μl ATP (0 – 4 mM). Reaction was stopped after 25 min by the addition of 175 μl of 1 M H_2SO_4 . 50 μl of malachite green staining solution (0.122 % malachite green in 20% H_2SO_4) were added and incubated under vigorous shaking for 10 min. Absorbance was measured at 620 nm to quantify released phosphate. **C)** Copper binding studies on RAN1, CCH, ATX1 and CCHΔ. Functional folding of purified recombinant proteins was probed by copper binding studies using copper-BCA. Stepwise dilution of 50 μl protein solution in 50 mM HEPES, 300 mM NaCl pH 7.5 was titrated against a defined concentration of 50 μl copper (50 μM copper(I) as Cu-BCA_2 -complex) and copper transfer from Cu-BCA_2 -complex to the protein was monitored by measuring the absorbance at 354 nm. This assay was used as a qualitative method only to demonstrate copper(I) binding ability of RAN1, CCH, ATX1 and CCHΔ.

5.3 Funktionelle und strukturelle Charakterisierung der pflanzlichen Kupferchaperone ATX1 und CCH.

Manuskript in Vorbereitung

Titel: New insights in structural and functional properties of plant copper chaperones ATX1 and CCH

Autoren: Claudia Hoppen, Melanie Schwarten, Dieter Wilbold und Georg Groth

Eigener Anteil: 70%, Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente, Schreiben des Manuskripts.

New insights in structural and functional properties of plant copper chaperones ATX1 and CCH

Abstract

All known organisms possess copper-transporting chaperones of the ATX1 family. These soluble metal carriers safely guide monovalent copper – an essential cofactor in many cellular processes - through the cytoplasm and prevent detrimental radical forming reactions of the transition metal. Members of the ATX1 family have been shown to associate to cellular membranes via positively charged residues. The plant specific copper chaperone CCH of the ATX1 family harbours a C-terminal extension with so far unknown function. We could demonstrate that both plant copper chaperones are also able to interact with membranes but show different interaction properties to immobilized lipids. We propose that reduced lipid interaction is a function of the C-terminal tail. This property may ensure long distance transport of CCH by reducing the lingering time of the copper chaperone at membranous compartments such as the plant endomembrane system. Secondary structure predictions and homology modelling suggest that the C-tail forms an α -helical structure. However, solution NMR studies on purified CCH revealed that this region is mainly disordered. Physiological studies on seedlings of *A. thaliana* T-DNA lines of *atx1* and *cch* show complex phenotypes but again link copper ions transport to ethylene signalling. Phenotype of *atx1-1* displays constitutive triple response, which is also achieved by exposition of wild type seedlings to DC_AC50, an inhibitor of the mammalian homologue Atox1 and the copper chaperone for superoxide dismutase (CCS).

Introduction

Copper is a redox-active transition metal which is involved in essential cellular functions including the respiratory chain and in detoxification of reactive oxygen species (ROS) [1, 2]. In plants copper ions are an even more important micronutrient as functionally active parts of proteins involved in photosynthesis (plastocyanin) and ethylene signalling (ethylene receptors) [3]. Copper ions can switch between two redox states and therefore often function as electron acceptors and donators [4]. This redox active property of copper ions unfortunately bears also the risk of direct participation in Haber-Weiss/Fenton reactions leading to the formation of dangerous ROS [5]. Therefore, intracellular copper levels and transport are tightly regulated and all known organisms have developed so called copper chaperones to bind and shield copper ions during their transport through the cell to their final acceptor site [6]. Copper chaperones of the Antioxidant-1 family

(ATX1 family) have been found in all domains of life and share an overall similar structure consisting of a ferredoxin-like fold ($\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$) and a highly conserved MxCxxC copper binding motif [7]. These copper chaperones are presumed to predominantly accept and donate their metal cargo to membrane bound heavy metal-transporting ATPases (HMAs) [8]. In plants, direct interaction of ATX1-like proteins with HMA7 (also known as RAN1) and HMA5 have previously been shown and recent studies in our lab could demonstrate that copper chaperones also directly interact with ethylene receptors, a major group of copper proteins in plants [9-11].

Higher plants are unique as they possess two isoforms of copper chaperones, copper transport protein ATX1 and copper transport protein CCH [11]. ATX1 and CCH differ by a C-terminal extension of CCH of approx. 40 amino acids but share the same homology to ATX1-like proteins of other species regarding their N-terminal region [12]. Previous studies on CCH and ATX1 in the model organism *A. thaliana* suggested complementary roles for CCH and ATX1. ATX1 constitutes the major copper chaperone in intracellular copper transport while the plant specific CCH is supposed to be responsible for long-distance transport and intercellular copper distribution [13]. This is also indicated by conversely regulation of transcript levels of ATX1 and CCH under copper depletion and excess conditions [14]. Structural studies on the C-terminal extension via far-UV and CD spectroscopy revealed a high degree of flexibility and plasticity [15, 16]. Due to ionic self-complementation of the isolated C-terminus and therefore a high tendency for aggregation, structural studies on this region appeared to be rather challenging but far-UV and CD spectroscopy revealed changes in the C-terminus upon titration with the ionic detergent sodium dodecyl sulfate (SDS) or the structure inducing cosolvent trifluorethanol (TFE) [16]. Secondary structure predictions presumed an α -helical proportion that may interact with membranous structures [15]. In contrast, studies on peptides derived from this C-terminal sequence indicate a β -sheet conformation with amphipathic properties [16]. In this work, we further examined properties of ATX1, CCH and CCH Δ (a deletion mutant lacking the C-terminal extension) with main emphasis on the C-terminal extension. We asked what function exactly the C-terminal extension of CCH might have and how this is linked to structure and properties.

An inducible system for transient expression under low protein levels of fluorescently tagged proteins in *N. benthamiana* was applied to study in detail subcellular localization of ATX1, CCH and CCH Δ . Moreover, all three copper chaperones, ATX1, CCH and CCH Δ ,

were expressed in *E. coli*, purified to homogeneity and used for *in vitro* experiments. Purified proteins were analysed regarding liposome and lipid binding. In addition, structural studies on ^{15}N - ^{13}C labelled full length CCH were performed by solution NMR. Homology modelling was used for *in silico* structure prediction of ATX1, CCH and CCHA. Recent studies in our lab showed a role of ATX1 and CCH in copper delivery to ethylene receptors. Therefore, *Arabidopsis thaliana* knockout lines of ATX1 (SALK_026221, *atx1-1*), CCH (SALK_138593, *cch-1*) and a cross of both knockout lines (*cch-1 atx1-1*) were analysed regarding their phenotype.

Results and Discussion

Since transport from one cell to the neighbouring cell in plants is enabled by plasmodesmata (PD) at the plasmamembrane (PM), we analysed subcellular localization in more detail using aniline blue, a widely used PD marker, and FM4-64 to stain the PM (figure S1). However, no clear evidence for accumulation at PDs could be observed, neither for CCH nor for ATX1 or CCHA, when overexpressed in *N. benthamiana* leaves. Colocalization with FM4-64 remains obscure due to the overall abundance of the small copper chaperones. As an alternative, we used recombinant proteins of ATX1, CCH and CCHA, expressed in *E. coli* and purified to homogeneity to study lipid and membrane association on a molecular level. Functional folding of proteins was checked as described in [10]. All proteins did behave as expected for soluble proteins. First, we asked if the oligomerization status for the apo- and Cu-form differs for ATX1 and CCH. We therefore calculated the mass of ATX1, CCH and CCHA based on their hydrodynamic radius (r_{Hd}) for the apo- and Cu(I)-bound form (figure 1). For ATX1 and CCHA the mass calculated from r_{Hd} is slightly higher than expected, but still indicates a monomeric appearance for both, the apo- and the Cu(I)-bound form. Cu(I)-CCH instead displayed a doubling in the mass compared to apo-CCH (32.1 ± 6 kDa to 53.7 ± 5 kDa), indicating a dimerization upon

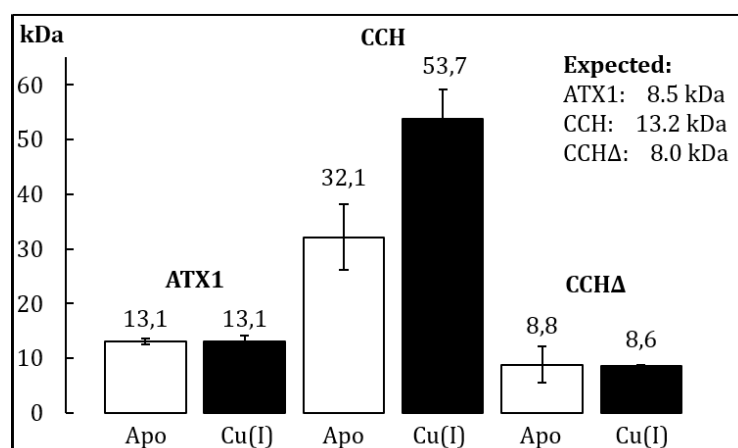


Figure 1 Mass determination of ATX1, CCH and CCHA. Copper chaperones treated with DTT or Cu(I) to ensure that copper chaperones are only present in the apo or Cu(I) bound state. The hydrodynamic radius (r_{Hd}) was measured and used for mass calculation. Apo and Cu(I)-forms of ATX1 and CCHA show no difference in mass. Cu(I)-CCH instead shows a gain in mass of ~20 kDa compared with apo-CCH. The size calculated for apo-CCH (32.1 ± 6 kDa) differs strongly from the expected mass and indicates a non globular proportion.

copper binding. Noteworthy, apo-CCH exhibits an approx. 40% higher mass than expected for a globular protein. For the deletion mutant CCH Δ none such discrepancy in size was detected thus indicating that the mass difference is attributed to the C-terminal extension. Previous studies on CCH already noticed altered electrophoretic mobility of CCH which was also associated to the C-terminal proportion [15]. This concludes, that the C-terminal proportion mediates dimerization of Cu(I)-CCH and contributes to a larger hydrodynamic radius of CCH.

Studies on the mammalian homolog of ATX1, Atox1 (or HAH1) could show association with membranes mediated by negatively charged lipids. We asked if membrane association is a feature of plant copper chaperones too. Therefore we analysed membrane association using liposome. We tested ATX1, CCH and CCH Δ in liposome sedimentation assays (LSA) to also investigate putative influence of the C-terminal extension on this property. Liposomes composed of DOPC only, DOPC/DOPS, DOPC/PiP-5 and DOPC/PiP-3,5, filled with raffinose to facilitate sedimentation, were incubated with His-tagged ATX1, CCH or CCH Δ . Samples of supernatants and pellets were collected and analysed by Western Blot for the abundance of copper chaperones.

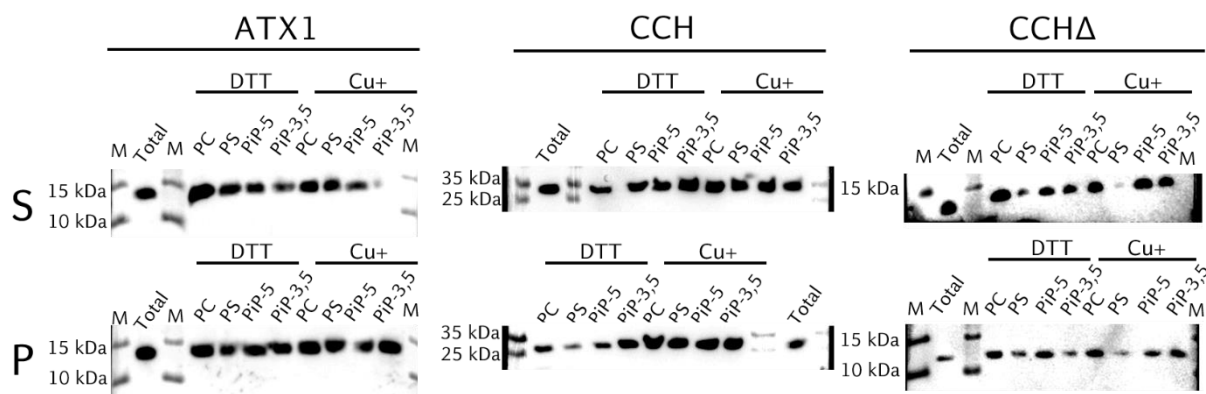


Figure 2 Western Blot analysis of liposome sedimentation assay of ATX1, CCH and CCH Δ . 400 nmol liposomes (400 nm diameter) of DOPC only, DOPC:DOPS 1:400, DOPC:PiP-5 1:400, DOPC:PiP-3,5 1:400 were probed for binding using 500 ng of His-tagged ATX1, CCH and CCH Δ in the absence (DTT) or presence of copper ions (Cu⁺). S: supernatants, P: pellets. All three forms showed sedimentation with the liposomes, regardless their copper state.

All three forms of copper chaperones could be found partially in the liposome and supernatant fraction, regardless the copper state as addition of DTT or Cu(I) had no significant impact on binding. These findings were in consistence with colocalization studies on ATX1 and CCH were both proteins expressed in *N. benthamiana* showed identical expression pattern (figure S2).

To test if the nature of lipids has an influence on binding of the chaperones we next used commercial PiPStrip and SphingoStrip membranes. Purified proteins of ATX1, CCH and CCHΔ were probed for lipid binding in lipid overlay assays (LOA) (figure 3).

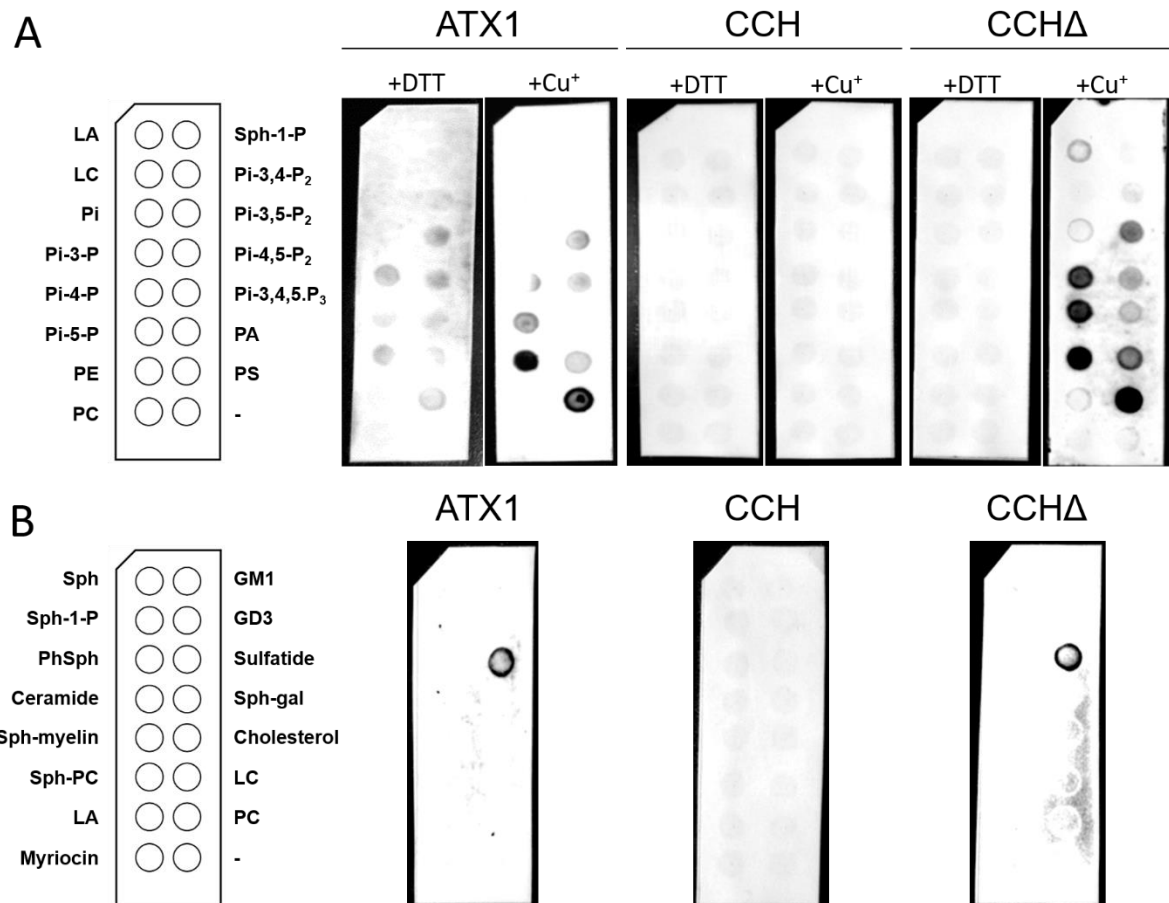


Figure 3 PiPStrip and SphingoStrip analysis of ATX1, CCH and CCHA. All proteins were freshly prepared by Size Exclusion Chromatography. Dilutions of 2 μM per protein were incubated with commercial PiPStrips (A) or SphingoStrips (B) over night. Identical exposure settings were used for all membranes. +DTT/+Cu⁺: 5 μM DTT or 5 μM Cu⁺ (complexed as Cu⁺-BCA₂) were added directly to the protein incubation step as copper chelator or donator. SphingoStrips were incubated with purified proteins without the addition of copper or chelator. Abbr.: LA: lysophosphatic acid, LC: lysophosphatidylcholine, Pi: phosphatidylinositol, Pi-X-P: phosphatidylinositol phosphate (phosphate group as indicated by number), PE: phosphatidylethanolamine, PC: phosphatidylcholine, Sph-1-P: Sphingosine 1- phosphate, PA: phosphatidic acid, PS: phosphatidylserine, Sph: sphingosine, PhSph: phytosphingosine, Sph-myelin: sphingomyelin, Sph-PC: sphingosylphosphocholine, GM1: Monosialoganglioside, GD3: Disialoganglioside, Sph-gal: sphingosylgalactoside, -: blank.

Interestingly, both “short” isoforms, ATX1 and CCHΔ, respectively, indeed showed lipid-binding properties, with strongest signals for phosphatidyl serine (PS), several PiPs and sulfatide. In contrast, full-length CCH did not show any lipid binding at all, pointing to an inhibitory effect of the C-terminal extension on lipid interaction. Furthermore, lipid binding seems to occur exclusively for Cu(I)-ATX1 and Cu(I)-CCHΔ. We are aware of the artificial nature that immobilized lipids on a membrane represent, but these data

nevertheless hint that the function of the C-terminal elongation of CCH involves altered lipid/membrane interaction, perhaps in a time dependent manner.

To gain more information about the structural properties of the three copper chaperone variants, homology models based on Phyre2 secondary structure predictions were generated (figure 4). Final models was selected by highest sequence identity and % of confidence. Structures shown for ATX1, CCH Δ and full-length CCH are built based on the N-terminal ferredoxin-like domain of copper chaperone for superoxide dismutase (CCS). Interestingly, exclusively positively charged residues, lysine and arginine, are found in proximity to the copper binding site. Such a clustering of positively charged amino acids has also been described for Atox1, and was shown to be connected to membrane association since alanine mutations of these residues resulted in decreased membrane affinity [17].

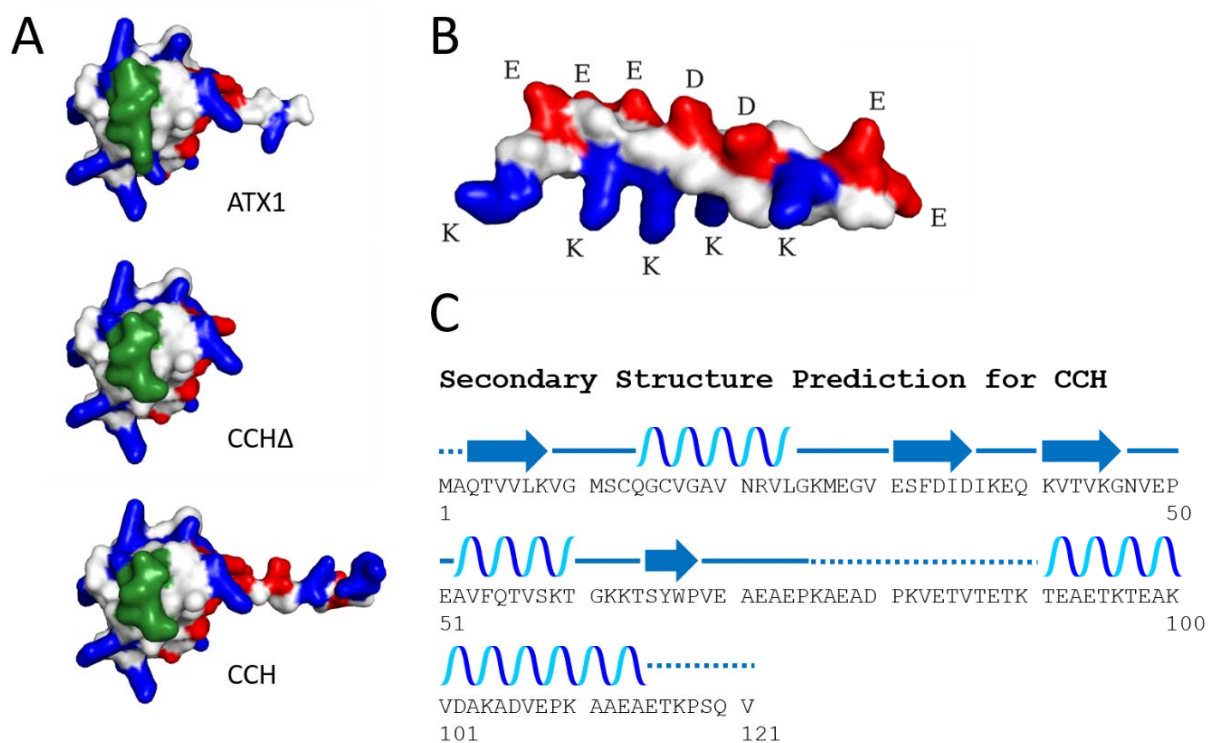


Figure 4 Structural models and secondary structure prediction of copper chaperones ATX1 and CCH. **A** Phyre2 models of ATX1, CCH and CCH Δ (excluding the C-terminal extension) based on copper chaperone for superoxide dismutase (CCS). For identity, confidence and coverage see methods section. Positively charged residues (blue, arginine and lysine) almost exclusively reside in vicinity to the copper binding motif (green) forming a positively charged ring. Negatively charged residues are displayed in red (glutamate and aspartate). **B** Phyre2 model of a putative helix in the C-terminal extension based on suppressor protein (STM1). Positively (blue) and negatively (red) charged residues are remarkably separated, forming an “ampholytic helix”. **C** Summary of secondary structure prediction for full-length CCH. Arrows indicate β -sheet folds, waves indicate α -helical regions, solid lines indicate random coils and dashed lines imply no secondary structure prediction for this region.

A similar mechanism is conceivable for the plant homologs. This hypothesis is underpinned by the conservation of involved lysine and arginine residues of Atox1 in ATX1 and CCH. For the C-terminal extension of CCH, an α -helix was modelled based on yeast suppressor protein (STM1). The position of this α -helix is identical to a previously predicted putative secondary structure element in this region [15]. Remarkably, positively and negatively charged residues show distinct separation resulting in an α -helix with two contrariwise charged sides. To further verify the existence of this α -helix, solution NMR studies on full-length CCH were performed. Assignment of ^1H - ^{15}N -HSQC spectra for apo-CCH and Cu-CCH were obtained (figure 5 and 6). Unfortunately, the copper binding motif MxCxxC was not resolved in these studies, probably due to high flexibility and fast ligand exchange in this region. Nevertheless, signals corresponding to the C-terminal were fully assigned (figure 5). Signals for this region point for an overall unstructured, regardless with or without addition of copper. Additionally, titration with liposomes had no effect on this region and has no effect on the structure of the extension (data not shown). Properties of this region remain complex and *in vitro* conditions do not seem to reflect properly the *in vivo* situation. It is also possible that this region is intrinsically disordered most of the time and only folds if certain conditions are met.

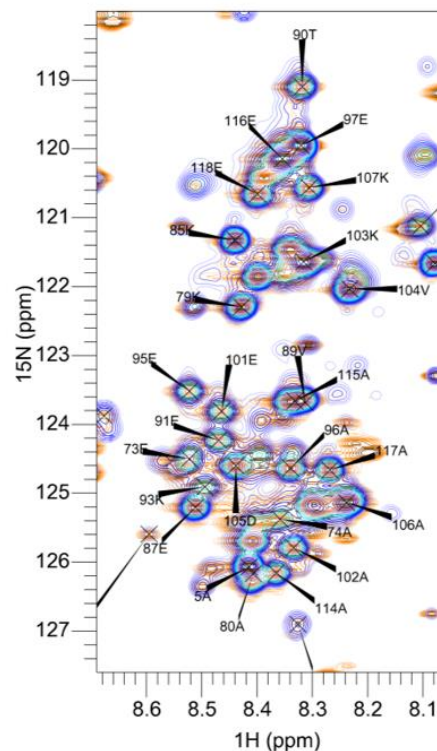


Figure 5 Zoom-in of the central peak clustering as overlay of apo- and Cu-CCH HSQC spectra. Interestingly, signals in this region belong to the C-terminal extension of CCH. The chemical shift do not differ between the apo- and the Cu-form. Chemical Shift Index (CSI) indicates that this region is unstructured.

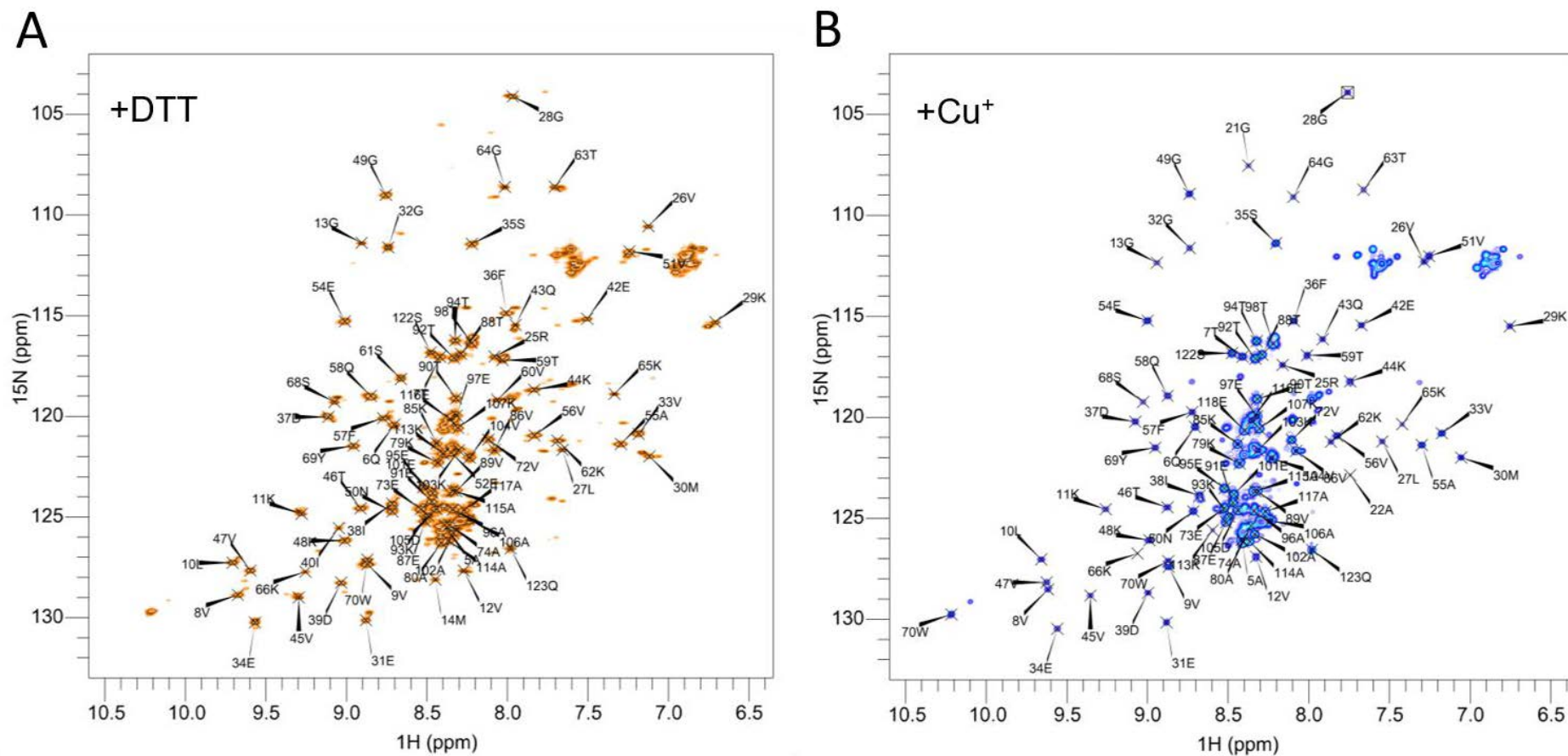


Figure 6 $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC spectra of ^{15}N labelled CCH. **A)** DTT as copper chelator was added to the protein resulting in apo-CCH formation. **B)** Cu^+ -BCA₂ complex was used as copper source resulting in Cu-CCH. Assignments of residues of both spectra were carried out and labels indicate the respective amino acid using the one-letter code. The copper binding motif (MxCxxC) remains invisible but overall changes in the chemical shifts for apo- and Cu(I)-CCH are visible.

Physiological assays of *A. thaliana* Col-0, *atx1-1*, *cch-1* and *cch-1 atx1-1* were performed and germination of seeds regarding their ethylene triple response (TR) was assayed. In the absence of copper, wild type ETR1 is assumed to be inactive and therefore showing a constitutive triple response [18]. In contrast mutation of the copper binding site of ETR1, e.g. in *etr1-1*, blocks the receptor into a constitutively active state and suppresses the ethylene response [18]. Recent studies in our lab indicated that soluble copper chaperones are involved in copper transport to the receptor and we were therefore expecting an effect on the ethylene triple response in copper chaperone mutant lines. Dark grown seedlings of Col-0, *atx1-1*, *cch-1* and *cch-1 atx1* w/o 10 μ M ACC were analysed after 3 days of incubation in the presence of silver nitrate (AgNO_3 , 10 μ M) and DC_AC50 (70 μ M). In these experiments AgNO_3 serves as an effective inhibitor of the ethylene response probably due to its potential to diminish copper binding sites at the ethylene receptors [19]. DC_AC50 was taken as a known inhibitor of the mammalian copper chaperones Atox1 and CCS that prevents the release of copper ions bound to these chaperones. This inhibitory effect of DC_AC50 on *in vitro* copper transfer was confirmed for ATX1 and CCH in binding studies with ethylene receptor ETR1 [10]. The hypocotyl length of dark-grown *A. thaliana* were used as an indicator for the ethylene triples response. Seedlings of ecotype Col-0 were used as control and hypocotyl length in absence of ACC was set as 100 %. Observations are summarized in figure 7. Interestingly, seedlings of *atx1-1* exhibited a constitutive ethylene triple response phenotype even in the absence of ACC. Addition of ACC still showed an effect and led to a more severe triple response. In contrast, *cch-1* and *cch-1 atx1-1* showed a wild type phenotype w/o ACC. All seedlings treated with the inhibitor DC_AC50 exhibited constitutive triple response similar to *atx1-1*. Also in this case seedlings were still able to respond to ACC. Addition of silver ions led to a complete insensitivity towards ACC. A slight attenuating effect of silver ions on *atx1-1* compared to wild type was observed. This is most likely due to the lack of the chaperone which is also required for an effective transport of silver ions [20]. The physiological data suggest that ATX1 is indeed involved in ion transport to ETR1. But again, ATX1 and CCH seem to have reverse function. Not only lack of CCH results in wild type ethylene phenotypes, moreover the absence of CCH somehow compensates the lack of ATX1. Since CCH also accumulates in senescing organs, it is possible that CCH at physiological conditions is not involved in copper transport to the receptor but rather in recycling the cofactor before targeting of the receptors for proteasomal degradation.

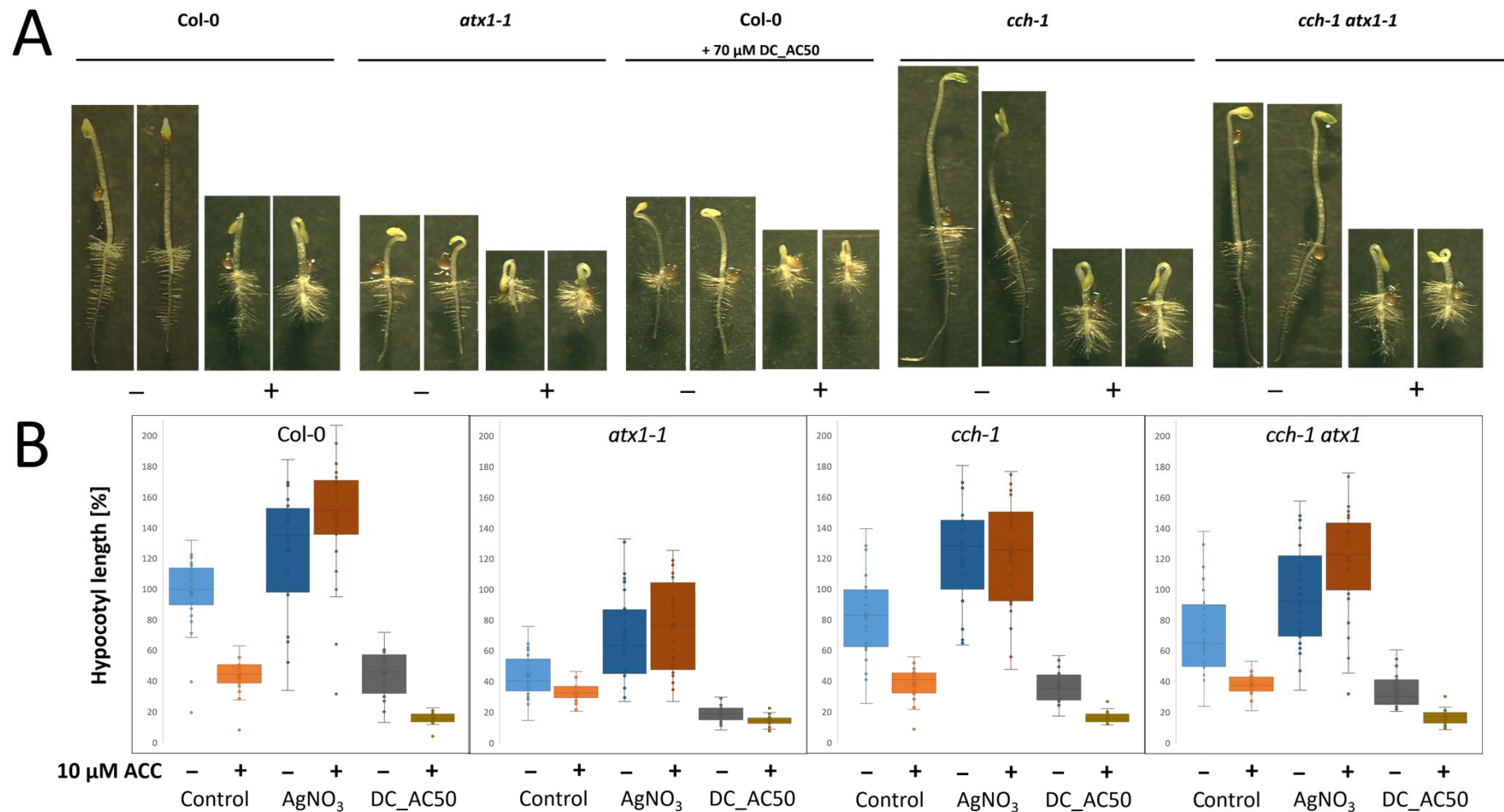


Figure 7 Triple Response Assay (TR) on *A. thaliana* seedlings. Seeds of *A. thaliana* Col-0, *atx1-1*, *cch-1* and *cch-1 atx1-1* were surface sterilized and after 4 days of stratification used to assay the TR with or without ACC (10 μ M) and additives AgNO₃ (10 μ M) or DC_AC50 (70 μ M). **A** Representative seedlings after 3 days grown in the dark at 22 °C with or without 10 μ M ACC and/or 70 μ M DC_AC50. Seedlings of *atx1-1* but not *cch-1* or the double mutant *cch-1 atx1-1* exhibit TR even without addition of ACC when grown in the dark. Remarkably, addition of DC_AC50, a specific inhibitor of ATX1-like copper chaperones, resulted in a similar phenotype as *atx1-1*, indicating that indeed DC_AC50 blocks ATX1 mediated copper transfer.

Another aspect is that the lack of both essential copper chaperones for sure results in oxidative stress, which triggers the upregulation of remaining chaperones e.g. copper chaperone for superoxide dismutase (CCS). Upregulation and compensation through the remaining copper chaperones is so far plausible hence otherwise knockout of ATX1 and CCH would probably result in a lethal phenotype. Since DC_AC50 was shown to block both, ATX1-like chaperones and CCS, all seedlings, including *cch-1 atx1-1*, treated with the inhibitor exhibited constitutive triple response. By blocking ATX1, CCH and CCS, copper transport to the receptor is abolished and the receptor is inactivated, triggering the ethylene triple response. The slight response to ACC indicates that copper transport is not 100 % blocked. Participation of small molecules known to be involved in transition metal homeostasis such as metallothioneins, phytochelatines and glutathione is conceivable. The data also show that DC_AC50 is a useful tool to study copper transport *in vivo*.

Summary

CCH is a plant specific variant of ATX1-like copper chaperones and differs from all other homologs by an approx. 40 amino acid C-terminal extension. ATX1 and CCHΔ are monomeric independent from their copper load. In contrast, copper seems to trigger dimerization of CCH. This “double-shielding” may be involved in ensuring safe long distance transport of the dangerous metal cargo. Furthermore, ATX1 and CCHΔ exhibits lipid binding properties, while CCH does not interfere with immobilized lipid. Thus, indicating an inhibitory effect of the C-terminal extension. Nevertheless, all three proteins seem to associate with liposomes composed of different lipids. We propose that the function of the C-terminal extension is to limit the tethering time of copper chaperones with membrane compartments and therefore allows CCH to diffuse through multiple cells before handing over its metal cargo to membrane bound copper transporting ATPases. While homology modelling of the C-terminus predicts an α-helical region, solution NMR structures of CCH revealed that this region is disordered. Further analysis taking into account the high flexibility of this region will be necessary to resolve structural features perhaps in a time dependent manner. *A. thaliana atx1-1* exhibits constitutive triple response, while *cch-1* and *cch-1 atx1-1* lines show wild type phenotypes. Therefore, ATX1 and CCH, most probably have conversely roles within copper ion transport for ethylene signalling. The inhibitor DC_AC50 trigger constitutive ethylene triple response in the absence of ACC, thus being a useful tool to study copper transport *in vivo* and gain more information on copper homeostasis under physiological conditions.

Material and Methods

Cloning and purification of recombinant proteins ATX1, CCH and CCHΔ. Coding sequences of *A. thaliana* ATX1 and CCH were cloned into pETEV16b vector. Deletion mutant CCHΔ was generated with Gibson Assembly using pETEV16b-CCH as template. Primers used in this work are listed in supplementary table S1. ATX1, CCH and CCHΔ were expressed and purified as described in [10]. If necessary His-Tag removal was achieved by digestion with TEV protease prior to the final purification step by size exclusion chromatography. The hydrodynamic radius (r_{Hd}) of ATX1, CCH and CCHΔ were determined using Fluidity-One W 488 with Alexa-488 labelled proteins diluted to a concentration of 1 μ M in 50 mM HEPES (pH 7.5) and 250 mM NaCl. Labelling of proteins was carried out as described in [10].

Isotope Labelling of CCH and NMR spectroscopy. *E. coli* BL21 (DE3) were transformed with pETEV16b-CCH. 100 ml 2YT media was inoculated with a single colony grown overnight at 37 °C and 180 rpm. Cells were harvested by centrifugation at 7500 x g for 15 min and the pellet resuspended in 30 ml M9 media supplemented with 15 N-ammonium chloride and 13 C-glucose. 6 x 500 ml M9 media supplemented with 15 N-ammonium chloride and 13 C-glucose were inoculated with 5 ml cell suspension and grown to an OD600 of 0.5 at 37 °C and 180 rpm. Cultures were cooled down to 16 °C and expression of CCH induced by addition of 0.5 mM IPTG. Cells were harvested after 14 h of expression by centrifugation at 7500 x g for 20 min and stored until purification at -20 °C. Purification was carried out as described for unlabelled CCH. NMR spectra were acquired using the 600 MHz NMR device in cooperation with the Biomolecular NMR Center (Forschungszentrum Jülich).

PipStrip and SphingoStrip Assay. Lipid Overlay assays were carried out using commercial PiPStrips and SphingoStrips from Echelon (purchased from Thermo Fisher Scientific). Strips were blocked in 3 % fatty acid free BSA in 1 x TBS-T for 3 h at room temperature under gentle agitation. His-tagged ATX1, CCH and CCHΔ, freshly purified by size exclusion chromatography, were diluted to a concentration of 2 μ M in 5 ml of 3 % fatty acid-free BSA in 1 x TBS-T. Blocked membranes were washed twice in 1 x TBS-T for 15 min and incubated with the protein solutions over night at 4 °C. 5 μ M DTT or Cu (I) as Cu₂-BCA were added directly to the protein solution and incubated with the membranes. After removal of the protein solution membranes were washed extensively with 1 x TBS-T for 3 h with several buffer exchanges. Membranes were incubated with α -His-HRP-antibody conjugate 1:10,000 in 3 % fatty acid-free BSA in 1 x TBS-T for 2 h. Membranes

were washed three times with 1 x TBS-T for 15 min. Chemiluminescence was detected using an LAS-4000 with exposure time set fix to 240 sec and standard conditions.

Liposome Sedimentation Assay. Liposome sedimentation assays were performed as described in Julkowska et al., 2013 [21]. Liposomes of DOPC, DOPS/DOPC (1:399), DOPiP-5/DOPC (1:399) and DOPiP-3,5/DOPC (1:399) were generated by sonification (Bandelin SONOPLUS, 15 % Output, 15 min, 1 sec pulse, 2 sec pause). The liposomes used in this work had a size of approx. 400 nm determined by Dynamic Light Scattering (DLS) using Zetasizer Nano NS (Malvern Panalytical). His-tagged ATX1, CCH and CCHΔ were freshly prepared by size exclusion chromatography to remove aggregates and larger complexed prior the sedimentation assay. Centrifugation steps were carried out at 30,000 x g at 21 °C for 15 min. Samples from the supernatants and the pellet were directly mixed with the appropriate amount of 4 x SDS sample buffer and stored at -20 °C until further analysis. Samples were incubated for 2 min at 95 °C, loaded onto a Tris/Tricine gel and electrophoresis was carried out for 1,5 h at 30 mA. Proteins were transferred onto a 0.2 µm PVDF membrane (GE Healthcare) by Semi-Dry Western Blot at 1 mA/cm² for 1.5 h. After transfer, membranes were immediately blocked using 5 % milk powder in 1 x TBS-T for 1 h at room temperature under gentle agitation. Membranes were incubated overnight at 4 °C with a 1:10,000 dilution of anti-His-HRP antibody conjugate (Milenyi Biotech) in 1 x TBS-T. Membranes were washed 3 times with 1 x TBS-T for 30 min and rinsed briefly in 1 x TBS prior exposure. Chemiluminescence was detected using an LAS-4000 with exposure time set fix to 120 sec and standard conditions.

Triple Response Assay of *A. thaliana* seedlings. Seeds of *A. thaliana* SALK_026221 (*atx1-1*), SALK_138593 (*cch-1*) and *cch-1 atx1-1* (cross of SALK_026221 and SALK_138593) were a kind gift from Prof. Kuo-Chen Yeh (Agricultural Biotechnology Research Center, Taipei, Taiwan). All lines were tested for the presence of T-DNA insertions by amplification of the genomic region via PCR (figure S3). Seeds were surface sterilized with chlorine gas. Triple Response Assay was carried out as described in Merchante and Stepanova, 2017 [22]. Surface sterilized seeds were plated on 1 x MS agar and stratification was carried out for 4 days at 4 °C in the dark. After 2 h of light exposure at 22 °C, plates were covered in aluminium foil and incubated for 3 days at 22 °C. Additives AgNO₃ (10 µM) or DC_AC50 (70 µM) were directly added to the media before plating the seeds. Plates were documented photographically and hypocotyl length was determined using FIJI (ImageJ) with hypocotyl length of wild type *A. thaliana* seedlings in the absence of ACC set to 100 % as internal reference.

Transient expression in *N. benthamiana* and confocal microscopy. The coding sequences of *A. thaliana* ATX1, CCH and CCHΔ were introduced into pAB111 (mVenus) or pAB118 (mCherry) using Gateway cloning to generate inducible expression vectors of C-terminally tagged fusion proteins [23]. Resulting constructs are further referred as ATX1-mVenus, ATX1-mCherry, CCH-mVenus, CCH-mCherry, CCHΔ-mVenus and CCHΔ-mCherry and were used to transform *A. tumefaciens* GV3101. *A. tumefaciens* transformed with the desired construct were grown over night at 28 °C and 200 rpm. Cells were harvested by centrifugation at 2000 x g and 4°C and resuspended in AS medium (5 % saccharose, 0.01 % Silwet L-77, 450 μM acetosyringone, spatula tips of MgSO₄ and glucose) to a final OD₆₀₀ of 0.4 and incubated on ice for at least 1 h. Four weeks old *N. benthamiana* plants were infiltrated with appropriate agrobacterial culture using a 1 ml syringe. Plants were grown for 3-5 days additional days in a plant chamber at 22 °C. Transient expression was induced by coating the leaves with 20 μM β-estradiol in 0.1 % Tween20 12 h before imaging. For callose staining of plasmodesmata, leaves were infiltrated with a 2:3 v/v mixture of 0.1% aniline blue and 1 M glycerol (pH 9.5) 15 -30 min prior image acquisition[24]. Appropriate leaf sections were imaged at room temperature using a Zeiss LSM780 confocal laser scanning microscope in cooperation with the *Center for advanced imaging* (CAi) at Heinrich-Heine University Düsseldorf. mVenus fluorescence was excited at 488 nm (Laser intensity: 1.8 – 6 %, emission: 503 -556 nm), while mCherry fluorescence was excited at 561 nm (Laser intensity: 2.2 – 4 %, emission: 570 – 624 nm). Aniline blue was excited at 405 nm (Laser intensity 2-6 %, emission: 460 – 500 nm). Pinhole was always adjusted to 1 Airy unit (AU). In addition, the chloroplast auto fluorescence was detected in a separate detector between 625 nm and 735 nm in the same track as the mCherry signal.

Protein Homology/analogY Recognition Engine V 2.0 (Phyre2) structure modelling. Amino acid sequences of ATX1, full-length CCH, CCHΔ (amino acids 1-71) and CterCCH (amino acids 72 -121) were analysed for homologue sequences using the Phyre2 prediction tool [25]. For ATX1(residues 4-76), CCH (residues 1-81)and CCHΔ (4-71) a model based on copper chaperone for superoxide dismutase (CCS) was generated (identity 26 %/26 %/22 %, confidence 99.7 %/99.7 %/99.7 %, coverage 94 %/94 %/66 %, respectively). For CterCCH, a model based on suppressor protein (stm1) for residues 92-116 was generated (identity 46 %, confidence 6.39 %, coverage 49 %, aligned residues 26/52).

Author contributions

G.G. conceived the project, C.H. and G.G. designed experiments. C.H. and M.S. performed the experiments. M.S. and D.W. advised and evaluated NMR experiments. G.G. and C.H. wrote the manuscript. All authors read and edited the manuscript prior to publication.

Acknowledgements

We would like to acknowledge the Center of Advanced Imaging (CAI) at the Heinrich Heine University Düsseldorf for providing access to the LSM780 and technical support during image acquisition. This work was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) – Projektnummer 267205415 – SFB 1208 (project B06 to GG, project B02 to D.W., project Z02 to SWP).

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Literature

1. Alscher, R.G., N. Erturk, and L.S. Heath, *Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants*. J Exp Bot, 2002. **53**(372): p. 1331-41.
2. Tsukihara, T., et al., *Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å*. Science, 1995. **269**(5227): p. 1069-74.
3. Mira H., S.V., Peñarrubia L., *Copper Homeostasis in Plants*. Handbook of Copper Pharmacology and Toxicology, 2002. **Humana Press**(Massaro E.J.).
4. Garcia, L., E. Welchen, and D.H. Gonzalez, *Mitochondria and copper homeostasis in plants*. Mitochondrion, 2014. **19 Pt B**: p. 269-74.
5. Kehrer, J.P., *The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity*. Toxicology, 2000. **149**(1): p. 43-50.
6. Harrison, M.D., C.E. Jones, and C.T. Dameron, *Copper chaperones: function, structure and copper-binding properties*. J Biol Inorg Chem, 1999. **4**(2): p. 145-53.
7. Palumaa, P., *Copper chaperones. The concept of conformational control in the metabolism of copper*. FEBS Lett, 2013. **587**(13): p. 1902-10.
8. Pufahl, R.A., et al., *Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor Atx1*. Science, 1997. **278**(5339): p. 853-6.
9. Andres-Colas, N., et al., *The Arabidopsis heavy metal P-type ATPase HMA5 interacts with metallochaperones and functions in copper detoxification of roots*. Plant J, 2006. **45**(2): p. 225-36.
10. Hoppen, C., et al., *Soluble and membrane-bound protein carrier mediate direct copper transport to the ethylene receptor family*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 10715.
11. Puig, S., et al., *Higher plants possess two different types of ATX1-like copper chaperones*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **354**(2): p. 385-90.
12. Himelblau, E., et al., *Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene ATX1 from Arabidopsis*. Plant Physiol, 1998. **117**(4): p. 1227-34.
13. Mira, H., F. Martinez-Garcia, and L. Penarrubia, *Evidence for the plant-specific intercellular transport of the Arabidopsis copper chaperone CCH*. Plant J, 2001. **25**(5): p. 521-8.
14. del Pozo, T., V. Cambiazo, and M. Gonzalez, *Gene expression profiling analysis of copper homeostasis in Arabidopsis thaliana*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **393**(2): p. 248-52.
15. Mira, H., et al., *Functional and conformational properties of the exclusive C-domain from the Arabidopsis copper chaperone (CCH)*. Biochem J, 2001. **357**(Pt 2): p. 545-9.
16. Mira, H., et al., *Ionic self-complementarity induces amyloid-like fibril formation in an isolated domain of a plant copper metallochaperone protein*. BMC Struct Biol, 2004. **4**: p. 7.
17. Flores, A.G. and V.M. Unger, *Atox1 contains positive residues that mediate membrane association and aid subsequent copper loading*. J Membr Biol, 2013. **246**(12): p. 903-13.
18. Zhao, X.C., et al., *Effect of ethylene pathway mutations upon expression of the ethylene receptor ETR1 from Arabidopsis*. Plant Physiol, 2002. **130**(4): p. 1983-91.
19. McDaniel, B.K. and B.M. Binder, *ethylene receptor 1 (etr1) Is Sufficient and Has the Predominant Role in Mediating Inhibition of Ethylene Responses by Silver in Arabidopsis thaliana*. J Biol Chem, 2012. **287**(31): p. 26094-103.
20. Veronesi, G., et al., *XAS Investigation of Silver(I) Coordination in Copper(I) Biological Binding Sites*. Inorg Chem, 2015. **54**(24): p. 11688-96.

21. Julkowska, M.M., J.M. Rankenberg, and C. Testerink, *Liposome-binding assays to assess specificity and affinity of phospholipid-protein interactions*. Methods Mol Biol, 2013. **1009**: p. 261-71.
22. Merchante, C. and A.N. Stepanova, *The Triple Response Assay and Its Use to Characterize Ethylene Mutants in Arabidopsis*. Methods Mol Biol, 2017. **1573**: p. 163-209.
23. Bleckmann, A., et al., *Stem cell signaling in Arabidopsis requires CRN to localize CLV2 to the plasma membrane*. Plant Physiol, 2010. **152**(1): p. 166-76.
24. Simpson, C., et al., *An Arabidopsis GPI-anchor plasmodesmal neck protein with callose binding activity and potential to regulate cell-to-cell trafficking*. Plant Cell, 2009. **21**(2): p. 581-94.
25. Kelley, L.A., et al., *The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis*. Nat Protoc, 2015. **10**(6): p. 845-58.

Supplemental Data

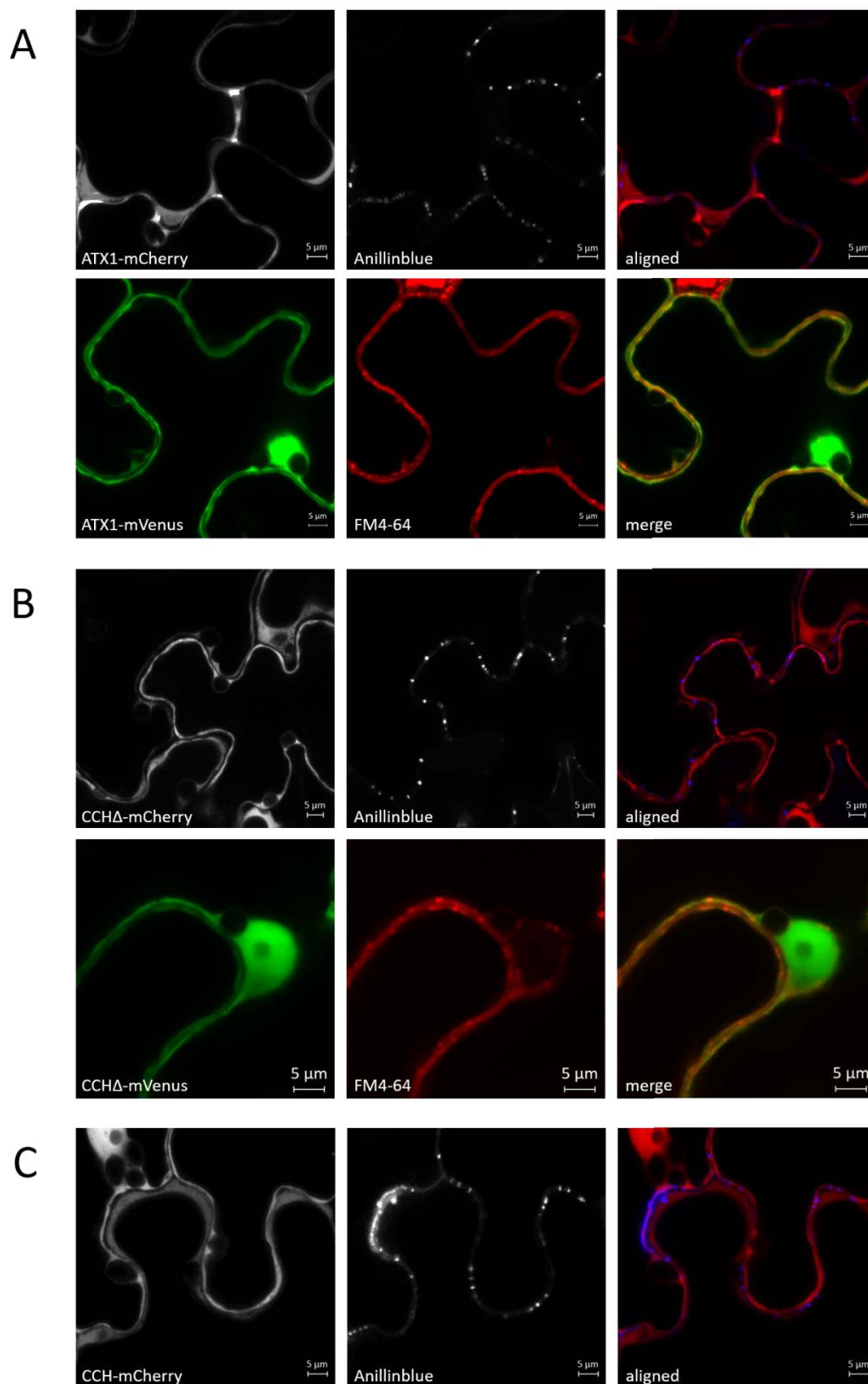


Figure S 1 Colocalization studies of fluorescently labelled ATX1, CCH and CCHA with PD marker anillin blue and membrane marker FM4-64 in *N. benthamiana*.

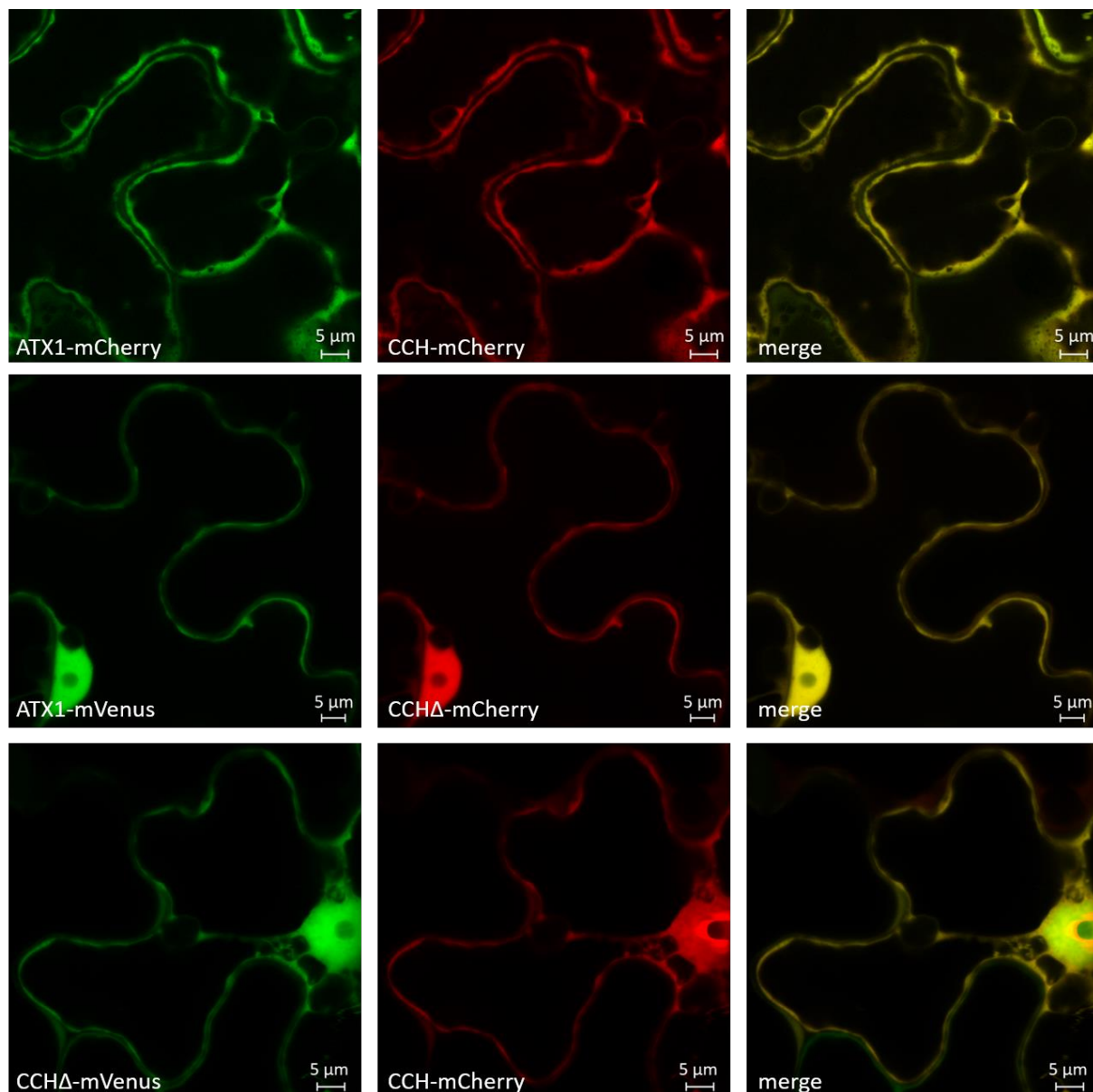


Figure S 2 Colocalization studies of fluorescence protein fusions of ATX1, CCH and CCHΔ in *N. benthamiana*.

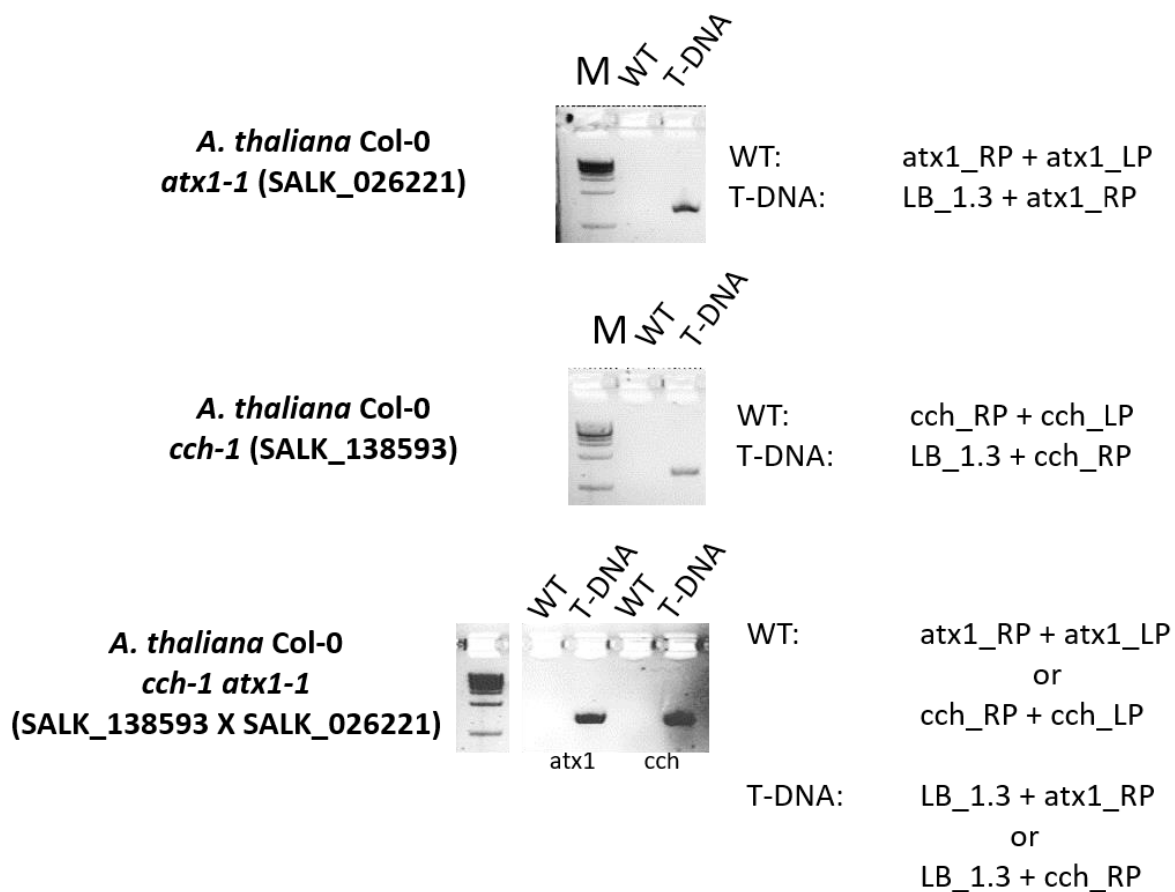


Figure S 3 Genotyping results of *A. thaliana* plants *atx1-1*, *cch-1* and *cch-1 atx1-1* prior seed collection. Genomic DNA from adult plants was isolated and tested for T-DNA insertion via PCR. Primer sequences were obtained using the T-DNA Primer Design Tool (SIGnAL)

6 Diskussion

Ethylen ist das kleinste Alken und ein gasförmiges Pflanzenhormon. Durch seinen Einfluss auf die Fruchtreifung und Seneszenz u. a. von Nutzpflanzen wie z. B. Tomaten, Äpfeln, Bananen und Avocado, ist die Aufklärung der Signalweiterleitung und die gezielte Manipulation auf molekularer Ebene von großem agronomischem Interesse. Pflanzen nehmen Ethylen durch eine kleine Familie von Ethylenrezeptoren wahr (Chang und Stadler, 2001). Diese Rezeptoren sind in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert (Chen et al., 2002). Diese zunächst ungewöhnlich erscheinende Lokalisation für Rezeptoren, ist durch den gasförmigen Zustand des Liganden Ethylen zu erklären. Ethylenrezeptoren sind Negativregulatoren und werden durch die Ligandenbindung inaktiviert. In Folge dessen findet kein proteasomaler Abbau des CEND von EIN2 mehr statt und es kommt zur Lokalisation des CEND in den Zellkern (Ju et al., 2012). Dort stabilisiert der CEND weitere Transkriptionsfaktoren und es kommt zur kaskadenartigen Aktivierung zahlreicher Gene, wodurch die Ethylenantwort ausgelöst wird (Chang et al., 2013).

Zur Ethylenwahrnehmung benötigen Ethylenrezeptoren einen Kupferkofaktor (Burg und Burg, 1967). Eine erste direkte Verknüpfung zwischen Kupferhomöostase und Ethylensignaltransduktion fand durch Identifikation des Kupfertransporters RAN1 in Ethylen-Dreifach-Antwort-Assays statt (Hirayama et al., 1999). RAN1, auch als HMA7 bezeichnet, gehört zur Familie der *Copper-transporting Heavy Metal* ATPasen (HMAs) und ist der Subfamilie der P_{1B}-Typ ATPasen zuzuordnen. Die Bereitstellung von Kupfer für membranständige HMAs erfolgt über kleine lösliche Kupferchaperone der Antioxidant-1 (ATX1) –Familie, von denen in höheren Pflanzen einzigartiger Weise zwei Homologe existieren, ATX1 und CCH (Himmelblau et al., 1998; Puig et al., 2007). CCH unterscheidet sich von ATX1 durch eine C-terminale Elongation um ca. 40 Aminosäuren, deren Funktion in der intrazellulären Kupfermobilisierung vermutet wird (Mira et al., 2001a; Mira et al., 2001b; Puig et al., 2007). So konnte CCH in zellkernlosen Zellen, sowie im Vaskulargewebe von Pflanzen gefunden wurde (Mira et al., 2001a).

In dieser Arbeit wurde der Effekt von NOP-1, eines neuartigen Peptidinhibitors des Ethylensignalweges, auf die Seneszenz von Schnittblumen untersucht und auf molekularer Ebene aufgeklärt. Außerdem wurde der Transportweg von Kupfer zu den ER-ständigen Rezeptoren aufgeklärt und neue Erkenntnisse über die pflanzlichen Kupferchaperone ATX1 und CCH, sowie des Kupfertransporters RAN1, gewonnen.

6.1 Neuartiger Peptidinhibitor verzögert die Seneszenz von Schnittblumen

Alle bisherigen Methoden zur Seneszenz- und Reifeverzögerung in klimakterischen Früchten und ethylen-sensitiven Zierpflanzen haben Vor- und Nachteile. Ein aus mehrerer Hinsicht neuartiger Ansatz stellt das Peptid *NLS-derived Octapeptide-1* (NOP-1) dar. Wie für Peptide üblich, zeichnet sich auch NOP-1 durch eine hohe Löslichkeit in Wasser aus. Ebenso ist davon auszugehen, dass es nicht zu einer mit Silber vergleichbaren Akkumulation in Biosystemen kommt, da es durch seinen Peptidcharakter in der Umwelt leicht zersetzt werden kann. Um den Wirkmechanismus von NOP-1 auf ethylen-sensitive Zierpflanzen zu untersuchen, wurden Seneszenzstudien an Schnittblumen von Nelken und Rosen durchgeführt (s. Kapitel 5.1). In beiden Fällen konnte das Verwelken der Schnittblumen um 6-8 Tage verzögert werden (Kapitel 5.1, Figures 1 und 2). Die Aufnahme des Peptids durch die Stängel konnte visualisiert und somit nachgewiesen werden (Kapitel 5.1, Figure 3). Eine durch Bindungsstudien ermittelte Dissoziationskonstante (K_D) von $3,5 \pm 0,6 \mu\text{M}$ für den Nelkenrezeptor DcETR1 und NOP-1 deutet darauf hin, dass der zu Grunde liegende Mechanismus, welcher die Seneszenz hinauszögert, auf eine Störung des ETR1/EIN2-Komplexes, wie bereits für *A. thaliana* gezeigt, zurückzuführen ist (Kapitel 5.1, Figure 4) (Bisson und Groth, 2015). Ebenso konnte eine hochaffine Bindung zwischen dem Ethylenrezeptor ETR1 aus Nelke und EIN2 aus *Arabidopsis* gemessen werden ($K_D = 136 \pm 0.4 \text{ nM}$). Die für NOP-1 zugrundeliegende NLS-Sequenz lässt sich bis zu einzelligen Organismen, wie der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* nahezu unverändert zurückverfolgen (Bisson et al., 2016). Dies ist auf den hohen Grad der Konservierung der Hauptkomponenten des Ethylensignalweges, EIN2 und ETR1, zurückzuführen und deutet bereits jetzt auf ein breites Wirkungsspektrum von NOP-1 auf verschiedene Nutzpflanzenspezies hin (Kapitel 5.1, Figure 5) (Bisson et al., 2016). Die Bindung von NOP-1 an den Rezeptor ist zudem extrem robust, wie durch Substitution von einzelnen Aminosäuren im Oktapeptid mit Alanin bereits gezeigt werden konnte. Diese hatten sowohl keinen Einfluss auf die Inhibierung des ETR1/EIN2-Komplexes in *A. thaliana*, als auch auf die Verzögerung der Fruchtreife von Tomaten (Bisson und Groth, 2015). Eine Verlängerung der Peptidsequenz erwies sich ebenfalls für die inhibierende Wirkung von NOP-1 auf Tomaten als förderlich und ähnliche Experimente sollten für Schnittblumen durchgeführt werden (Bisson und Groth, 2015). Dadurch könnte vermutlich der Seneszenzprozess von Schnittblumen weiter

hinausgezögert werden. Gleichzeitig könnten auch neue Erkenntnisse über die Aufnahme von Stoffen durch die Stängel von Schnittblumen, wie z. B. Größenbeschränkungen und möglicherweise physikalisch-chemische Eigenschaften (Ladung, funktionelle Gruppen) der zu transportierenden Stoffe gewonnen werden.

EIN2 ist ein strukturell wie funktionell komplexes Protein, welches zusätzlich zur Funktion in der nachgeschalteten Ethylenantwort auch eine Rolle in der Überschneidung mit weiteren Pflanzenhormonen wie z. B. Abscisinsäure (ABA) spielt (Wang et al., 2007). Es ist daher denkbar, dass die Zugabe eines synthetischen Fragments von EIN2 nicht nur Auswirkungen auf ethylen-gesteuerte Gene hat. Insbesondere der lösliche CEND von EIN2, welcher die NLS-Sequenz trägt, scheint noch zusätzliche Funktionen im Zytosol aufzuweisen (Zheng und Zhu, 2016). Sollte die NLS-Sequenz darin involviert sein, könnte NOP-1 helfen diese zusätzlichen Funktionen von EIN2 zu charakterisieren. Zudem wären Lokalisationsstudien von NOP-1 in Pflanzenzellen spannend. Kleine, lösliche Peptide können frei im Zytosol und eventuell auch im Zellkern diffundieren (Fei et al., 2011). Eine gezielte Rekrutierung von NOP-1 an die Membran des ERs, könnte die Wirkung noch erhöhen.

Ein weiterer Aspekt der bislang kaum untersucht wurde betrifft die Aminosäuresequenz von NOP-1. Diese weist eine Vielzahl von positiv geladenen Resten auf (Lysin und Arginin), weshalb die Möglichkeit einer Adsorption an negativ geladene Oberflächen besteht. Bei den bisherigen Versuchen an Tomaten und auch für Seneszenzversuche mit Schnittblumen, wurden Gefäße aus Polypropylen (PP) verwendet, welches adsorptive Eigenschaften für geladene Moleküle aufweist (Kristensen et al., 2015). Adsorption von NOP-1 an Oberflächen vermindert die tatsächliche Verfügbarkeit und damit die Wirksamkeit des Peptids. Insbesondere Schnittblumen werden häufig in Glasvasen aufbewahrt, welches hauptsächlich aus Siliciumdioxid besteht und eine polare Oberfläche aufweist. Zudem konnte die Adsorption von Proteinen und Peptiden an Glas bereits gezeigt werden (Brash und Davidson, 1976). Eine Adsorption von NOP-1 auf polare Oberflächen sollte daher überprüft werden, um ggf. Aminosäuresubstitutionen in Betracht zu ziehen, welche die Adsorption verringern.

Abschließend bleibt zu bemerken, dass das inhibitorische Peptid NOP-1 direkt aus der Grundlagenforschung zum Ethylensignalweg hervorgegangen ist und daher ein eindrucksvolles Beispiel für die Bedeutung und den Nutzen einer molekularen Aufklärung von biologischen Prozessen für die Entwicklung neuartiger Wirkmechanismen, auch in der Pflanzenforschung, darstellt.

6.2 Kupfer erreicht die Ethylenrezeptoren auf zwei Wegen

Eine Beteiligung von ATX1 und CCH an der Bereitstellung von Kupfer für RAN1 und somit letztendlich auch ETR1, wurde durch Kombination von biochemischen und physiologischen Experimenten in dieser Arbeit untersucht (s. Kapitel 5.2). Erstmals konnte eine eindeutige Lokalisation von RAN1 am ER gezeigt werden (Kapitel 5.2, Figure 1). Die Lokalisation am ER ermöglicht eine direkte Kupferübertragung zwischen RAN1 und den Ethylenrezeptoren. Durch Verwendung eines induzierbaren Promotors (XVE-Promotor) und Untersuchung verschiedener Zeitpunkte nach Induktion der Expression, konnte ein Effekt auf die Lokalisation durch die vermehrte Expression von RAN1-mVenus ausgeschlossen werden (Kapitel 5.2, Supplemental Figure S1) (Bleckmann et al., 2010). Bisherige Lokalisationsstudien mit RAN1 wurden unter Verwendung eines starken konstitutiven Promotors (d35S-Promotor) durchgeführt, wodurch es möglicherweise zur Übersättigung der Membranen und somit zu einer Fehllokalisation im gesamten Endomembransystem kam (Li et al., 2017b). In dieser Arbeit wurde hingegen ein induzierbarer Promotor verwendet, wodurch niedrige Expressionslevel und eine zeitliche Kontrolle möglich waren (Kapitel 5.2, Figure 1).

Durch Verwendung einer redox-sensitiven Variante des *Green Fluorescence Protein* (roGFP2), entwickelt von Brach et al., 2009, wurde erstmals experimentell die Topologie einer pflanzlichen HMA bestimmt. Es werden N- und C-terminale Fusionsproteine generiert und Fluoreszenzaufnahmen sowohl bei 405 nm- als auch 488 nm-Anregung durchgeführt. Durch ratiometrische Analyse und statistischen Vergleich mit Kontrollkonstrukten konnte ermittelt werden, dass beide Termini von RAN1 ins Zytosol ragen (s. Kapitel 5.2, Figure 1). Dies bedeutet, dass sowohl die N-terminalen MBDs, als auch die A- und N- Domänen in RAN1 sowohl für zytosolische Proteine, als auch für den zytosolischen Teil der ETRs zugänglich sind. Basierend auf diesem Wissen wurden für die nachfolgenden Interaktionsstudien zwei Deletionskonstrukte von RAN1 hergestellt, NterRAN1 und CterRAN1. NterRAN1 umfasst die Aminosäuren 1-298 und damit beide MBDs, während in CterRAN1 (Aminosäuren 299 -1001) diese MBDs deletiert sind. Umfangreiche *Bimolecular Fluorescence Complementation* (BiFC) Assays und quantifizierende *Microscale Thermophoresis* (MST) Messungen wurden durchgeführt, um die Interaktionen zwischen RAN1 und den Ethylenrezeptoren, sowie den Kupferchaperonen ATX1 und CCH zu untersuchen (Kapitel 5.2, Figures 2-4).

Eine direkte Interaktion zwischen RAN1 und ATX1 wurde bereits durch Y2H und BiFC Assays gezeigt, sodass diese Interaktion als Positivkontrolle für eine funktionelle

Expression diente (Li et al., 2017b). In dieser Arbeit konnte ebenfalls eine Interaktion zwischen der pflanzenspezifischen Isoform CCH und RAN1 detektiert werden. Zusätzlich wurde in MST-Messungen eine Deletionsmutante von CCH, CCH Δ , ohne C-terminale Elongation eingesetzt. Eine Bestimmung der Dissoziationskonstanten (K_D) für die drei Chaperonvarianten (ATX1, CCH und CCH Δ) mit RAN1 zeigte in allen drei Fällen eine hochaffine Bindung ($K_D = 41 - 77$ nM). Dies steht im Widerspruch zu früheren Y2H-Untersuchungen, in denen CCH keine Interaktion mit RAN1 aufwies (Puig et al., 2007). Tatsächlich verschlechtert die Anwesenheit der C-terminalen Elongation leicht die Affinität zu RAN1 ($K_D = 77$ nM zu 55 nM). Dies stellt aber immer noch eine hochaffine Bindung dar. Möglicherweise könnte dies an der Fehleranfälligkeit der Y2H-Methode liegen. Diese weist nicht nur eine hohe Fehlerrate für falsch-positive Ergebnisse auf, sondern liefern je nach System auch 60 bis 85 % falsch-negative Ergebnisse (Chen et al., 2010). Zudem sind die Interaktionsstudien in diesen Experimenten nicht kompartimentspezifisch. In dieser Arbeit konnte eine Interaktion zwischen RAN1 und CCH durch zwei unabhängige Methoden gezeigt werden (MST und BiFC).

Erstmals konnte ebenso eine direkte Interaktion zwischen RAN1 und den Ethylenrezeptoren ETR1 und ERS1 nachgewiesen werden. Zudem konnte bestimmt werden, welche Domänen von RAN1 und ETR1 für die Interaktion wichtig sind. Interessanterweise zeigen sowohl die BiFC-Daten als auch die MST-Messung, dass für die Interaktion zwischen RAN1 und ETR1 die Transmembrandomäne von ETR1 (ETR1¹⁻¹⁵⁷) ausreichend ist ($K_D = 33 \pm 8$ nM). Die Interaktion mit ETR1¹⁻¹⁵⁷ wird von den N-terminalen MBDs von RAN1 (NterRAN1, $K_D = 205 \pm 35$ nM) und kaum durch CterRAN1 ($K_D = 2611 \pm 504$ nM) vermittelt. Dies wird ebenfalls durch BiFC-Daten unterstützt. Da der Transmembranbereich von ETR1 zudem auch die Kupfer- und Ethylenbindestelle beinhaltet, ist eine Übertragung von Kupfer durch die MBDs auf ETR1 denkbar. Bindungsstudien mit einer ETR1-Variante mit fehlendem Transmembranbereich (ETR1³⁰⁶⁻⁷³⁸) deuten auf eine zusätzliche Stabilisierung der Interaktion beider Vollängenproteine durch den verbleibenden Teil von RAN1 (CterRAN1, $K_D = 211 \pm 38$ nM) hin, während NterRAN1 nur eine sehr schwache Bindung zu ETR1³⁰⁶⁻⁷³⁸ zeigt ($K_D = .3476 \pm 315$ nM). Ein Einfluss des Detergenzes FosCholin-16, welches zur Solubilisation von ETR1 und RAN1 eingesetzt wurde, konnte in Kontrolltitrationen ausgeschlossen werden.

Erstmals konnte sowohl durch BiFC, als auch durch MST-Messungen eine direkte Interaktion zwischen den löslichen Kupferchaperonen ATX1 und CCH und ETR1 gezeigt

werden (Kapitel 5.2, Figures 3 und 4). Für die Interaktion erwies sich ebenfalls der Transmembranteil von ETR1 als ausreichend, welcher die Kupferbindestelle trägt. Es zeigte sich jedoch eine mindestens 10-fach schwächere Bindung der Chaperone zu ETR1 als RAN1 zu ETR1 (Chaperone-ETR1: $K_D = 313$ bis 526 nM, RAN1-ETR1: $K_D = 33 \pm 8$ nM). Die Affinität von CCH war zudem etwas schlechter als für die beiden kürzeren Chaperone ATX1 und CCHΔ. Die C-terminale Elongation scheint die Interaktion daher leicht zu stören. Außerdem konnte keine Interaktion der Chaperone mit ETR1³⁰⁶⁻⁷³⁸ gemessen werden, was bedeutet, dass die Bindung nur mit dem Transmembranteil von ETR1 erfolgt.

Kupferchaperone vom ATX1-Typ weisen eine hohe Ähnlichkeit zu bisher gelösten Strukturen von MBDs in HMAs auf und auch eine Kristallstruktur der ersten MBD von RAN1 zeigt die typische Ferredoxin-ähnliche Faltung (Zimmermann et al., 2009). Es ist daher möglich, dass die strukturelle Ähnlichkeit dafür verantwortlich ist, dass beide Proteine, ATX1 bzw. CCH und die MBDs von RAN1, in der Lage sind mit den Rezeptoren zu interagieren. Dies könnte auch die 10-fach schwächere Affinität zwischen ETR1 und den Chaperonen erklären, da zwar eine Interaktion mit der Transmembrandomäne stattfindet, die stabilisierende Wirkung von CterRAN1 an ETR1³⁰⁶⁻⁷³⁸ jedoch ausbleibt. Erste Transferversuche mit kupferbeladenem ATX1 und CCH zeigten zudem, dass eine Übertragung von Kupfer auf den Rezeptor *in vitro* stattfindet (Kapitel 5.2, Figure 4, s. a. Dissertation von Lena Müller, Institut für Biochemische Pflanzenphysiologie, 2019). Dies stellt zudem den ersten experimentellen Nachweis für einen Kupfertransfer von ATX1-Typ Chaperonen im pflanzlichem System mit Proteinen dar, welche nicht zur Familie der HMAs gehören.

Alle Ergebnisse der Interaktionsstudien, sowie der Kupfertransferrmessungen zusammengekommen, deuten auf die Möglichkeit von zwei Kupfertransportwegen zu den Rezeptoren hin (Kapitel 5.2, Figure 5). Der aufgrund der höheren Affinitäten der Proteine favorisierte Weg stellt dabei den sequenziellen Transport des Kupfers durch die löslichen Chaperone über RAN1 zu den Rezeptoren dar. Ein Vorteil dieses Transportweges ist, dass Kupfer zunächst an die ER-Membran und somit in die Nähe des Rezeptors transportiert wird. Von dort aus belädt RAN1 die Rezeptoren mit Kupfer oder stellt es dem Sekretionsweg zur Verfügung, falls ein Kupferüberschuss vorhanden ist. Den zweiten Transportweg stellt die direkte Bereitstellung von Kupfer für die Rezeptoren durch die Chaperone dar. Durch die ermittelten Bindungskonstanten liegt die Vermutung nahe, dass dieser Weg möglicherweise eine Backup-Route für die Kupferbereitstellung ist. Im Falle von Mangel wird Kupfer bevorzugt zu photosynthetisch wichtigen Proteinen wie z. B.

Plastocyanin transportiert (Shahbaz et al., 2015). Um dennoch die Ethylenrezeptoren zu versorgen, könnte dieser „Kurzschluss“ von ATX1 auf ETR1 nötig sein. Dies sorgt dafür, dass z. B. im Falle eines Pathogenbefalls die Ethylenantwort immer noch ausgelöst werden kann, um somit die Immunantwort der Pflanze zu initiieren (Mauch et al., 1984). Des Weiteren ist nicht klar, ob die beiden Varianten ATX1 und CCH überlappende oder entgegengesetzte Funktionen im Hinblick auf den Kupfertransport aufweisen. Da für CCH eine Rolle im Langstreckentransport von Kupfer angenommen wird, erscheint es auch möglich, dass CCH nicht den Rezeptor beliefert, sondern beim Abbau des Rezeptors den Kofaktor aufnimmt. Ein Indiz hierfür könnte die entgegengesetzte Regulation der Transkripte für *atx1* und *cch* in *A. thaliana* sein (del Pozo et al., 2010). CCH wird als einziges Chaperon durch Kupferüberschuss herunterreguliert (del Pozo et al., 2010). Die Mittel zur direkten Verfolgung von Kupferionen *in vivo* sind begrenzt, doch möglicherweise könnte durch eine Kombination verschiedener Methoden (Kupfersonden z. B. *CopperGreen*, Pulse-Chase Experimente, MALDI-Imaging) der Kupfertransport in pflanzlichen Zellen visualisiert werden.

6.3 Funktions- und Strukturunterschiede zwischen den pflanzlichen Kupferchaperonen ATX1 und CCH

In dieser Arbeit wurden erstmals unterschiedliche Proteineigenschaften von ATX1 und CCH *in vitro* identifiziert, welche in Relation zum vermuteten Langstreckentransport gebracht werden können. ATX1 und CCH zeigen ein unterschiedliches Oligomerisierungsverhalten in An- und Abwesenheit von Kupfer (Kapitel 5.3, Figure 1). Während sowohl apo-ATX1 als auch Cu-ATX1 als Monomer vorliegen, induziert die Bindung von Kupfer eine Dimerisierung von Cu-CCH. Die Deletionsmutante CCH Δ hingegen verhält sich wie ATX1 und behält auch nach Kupferbindung eine Masse, welche dem Monomer zugeordnet werden kann. Daraus kann geschlossen werden, dass der C-Terminus von CCH für die Dimerisierung essentiell ist. Unklar ist, ob die Dimerisierung direkt über den C-Terminus erfolgt. Die „doppelte Abschirmung“ des Kupfers könnte einen mechanistischen Trick zur Gewährleistung eines sicheren Langstreckentransportes des reaktiven Metalls sein und die vorzeitige Freisetzung verhindern.

Für das humane Homolog von ATX1 konnte eine Assoziation an Membranstrukturen gezeigt werden, welche über negativ geladene Reste vermittelt wird (Flores und Unger, 2013). Die beteiligten Reste sind auch in den pflanzlichen Kupferchaperonen ATX1 und CCH konserviert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die pflanzlichen Chaperone ebenfalls an Membranen in Form von Liposomen binden. Durch diese Membranassoziation werden vermutlich die löslichen Chaperone in die Nähe der Interaktionspartner, den HMAs, gebracht und der Kupfertransfer erleichtert. In Bindungsstudien mit immobilisierten Lipiden zeigte sich jedoch, dass die C-terminale Elongation einen störenden Einfluss hat. Sowohl ATX1 als auch CCH Δ zeigen Bindung an verschiedene Lipide, während CCH keine Bindung zeigte. Dies ist der erste Hinweis auf eine Funktion des C-Terminus in Bezug auf Membranbindung. Im Falle von CCH inhibiert der C-Terminus eine Interaktion mit Lipiden, vermutlich um einen effektiven Langstreckentransport durch die Minimierung der Wechselwirkung mit Biomembranen zu gewährleisten. Da alle drei Varianten jedoch gleichermaßen mit Liposomen interagieren ist davon auszugehen, dass die Funktion des C-Terminus von CCH in einer Art Verminderung und nicht vollständigen Inhibierung der Retentionszeit liegt. Die durch *in silico Modelling* generierten Strukturvorhersagen basierend auf CCS zeigen für ATX1, CCH und CCH Δ eine Ansammlung von positiv geladenen Resten rund um die Kupferbindestelle. Dies ist zunächst überraschend, da in der Nähe des ebenfalls positiv

geladenen Kupferions saure Reste erwartet werden würden. Aus Studien zum Homolog Atx1 aus Hefe konnte aber gezeigt werden, dass Lysine regulatorisch essenziell für die Wiederfreisetzung von Kupfer und die Übertragung auf HMAs sind (Portnoy et al., 1999). Diese distinkte Anordnung ist für Atx1 aus Hefe und Atox1 nicht so stark ausgeprägt und scheint daher ein pflanzenspezifisches Merkmal zu sein. Weitergehende Mutagenesestudien dieser Reste könnten identifizieren, welche Reste für die Membranassoziation und welche für die Regulation in den pflanzlichen Kupferchaperonen verantwortlich sind. Des Weiteren wurde durch *in silico modelling* ein α -helikaler Bereich im C-Terminus von CCH postuliert, welcher über eine bemerkenswerte Positionierung negativ und positiv geladener Reste verfügt (Kapitel 5.3, Figure 4). Dadurch entsteht eine α -Helix mit einer positiven und einer negativen Fläche. Durch NMR-Spektroskopie konnte die Existenz dieser Helix jedoch nicht bestätigt werden. Die C-terminale Region ist unstrukturiert und zeigt keine Änderung in An- und Abwesenheit von Kupfer. Möglicherweise kommt es nur zur Ausbildung von Sekundärstrukturelementen, wenn bestimmte Bedingungen in der Zelle vorliegen oder wenn diese in der Nähe von Biomembranen sind.

Anhand der physiologischen Daten zur Ethylen-Dreifach-Antwort von *A. thaliana* konnten die Aufgaben von ATX1 und CCH im Kupfertransport zu Ethylenrezeptoren näher untersucht werden. Nur *atx1-1* zeigt eine konstitutive Ethylen-Dreifach-Antwort in Abwesenheit von ACC. Keimlinge von *cch-1* und *cch-1 atx1-1* wiesen wildtypische Phänotypen auf. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass ATX1 und CCH auch im Hinblick auf den Transport von Kupfer zu den Ethylenrezeptoren gegensätzliche Funktion haben, da nur bei Abwesenheit von ATX1 die Rezeptoren nicht mehr ausreichend mit Kupfer versorgt werden. Sowohl das Fehlen von CCH, als auch das Fehlen beider löslicher Kupferchaperone zeigt eine wildtypische Ethylen-Dreifach-Antwort. Dies deutet darauf hin, dass Kupferhomöostase auch im Hinblick auf die Versorgung der Ethylenrezeptoren komplex ist und CCH eine gegenteilige Rolle zu ATX1 einnimmt. Da der Verlust von ATX1 und CCH nicht in einem letalen Phänotyp resultiert, ist davon auszugehen, dass weitere an der Kupferhomöostase beteiligte Komponenten das Fehlen kompensieren. Der Inhibitor DC_AC50, welcher den Transfer von Kupfer zwischen ATX1 und CCS blockiert, löst eine starke konstitutive Dreifach-Antwort aus. Durch das Blockieren beider Proteinfamilien wird die Kupferhomöostase derart gestört, dass Kupfer nicht mehr beim Ethylenrezeptor ankommt. Dadurch liegen die Ethylenrezeptoren in einer inaktiven Form vor und es findet keine Unterdrückung der Ethylenantwort statt. Es liegt daher nahe, dass

u. a. CCS zur Kompensation des *cch-1 atx1-1* Phänotyps beiträgt. DC_AC50 erweist sich als nützlich zur Identifizierung von Proteinen, welche beteiligt sind an der Bereitstellung von Kupfer für die Ethylenrezeptoren. Zudem ist ein Mitwirken von niedermolekularen Verbindungen wie Metallothionein, Phytochelatinen und Gluthation möglich. Diese liegen teilweise in mM-Konzentrationen im Zytosol vor und unterstützen die hochspezifischen Kupferchaperone. Um zu überprüfen, ob es zur Hochregulation von CCS oder Metallothioneinen kommt, könnten die Transkript- und Proteinlevel durch quantitative *real-time* PCR bestimmt werden. Zudem sollte der Redox-Zustand anhand der intrazellulären Gluthation- und Gluthationdisulfid-Level ermittelt werden. Auch eine Regulation der Ethylenrezeptoren auf transkriptionaler bzw. post-translationaler Ebene in Abhängigkeit der Kupferverfügbarkeit ist möglich.

Durch Zusatz von 1-AVG, einem Inhibitor der ACC-Synthase, in weiteren *Triple Response Assays* von *atx1-1*, *cch-1* und *cch-1 atx1-1*, könnte durch Ausschalten der Biosynthese von Ethylen, außerdem Rückschluss auf eine Stressantwort gezogen werden. Dadurch könnte überprüft werden, ob der Phänotyp von *atx1-1* tatsächlich auf das Fehlen von Kupfer im Rezeptor zurückzuführen ist, oder nur eine Stressantwort darstellt. Insgesamt konnten neue Einblicke in den pflanzlichen Kupfertransport und Eigenschaften des pflanzenspezifischen Homologes CCH gewonnen werden.

7 Literatur

- ABDEL-GHANY, BURKHEAD, GOGOLIN, ANDRES-COLAS, BODECKER, PUIG, PENARRUBIA und PILON 2005. AtCCS is a functional homolog of the yeast copper chaperone Ccs1/Lys7. *FEBS Lett*, 579, 2307-12.
- ABELES, MORGAN und SALTVEIT 1992. *Ethylene in Plant Biology*, Academic Press Inc.
- ALONSO, HIRAYAMA, ROMAN, NOURIZADEH und ECKER 1999. EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis. *Science*, 284, 2148-52.
- ALSCHER, ERTURK und HEATH 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot*, 53, 1331-41.
- AN, ZHAO, JI, LI, JIANG, YU, ZHANG, HAN, HE, LIU, ZHANG, ECKER und GUO 2010. Ethylene-induced stabilization of ETHYLENE INSENSITIVE3 and EIN3-LIKE1 is mediated by proteasomal degradation of EIN3 binding F-box 1 and 2 that requires EIN2 in Arabidopsis. *Plant Cell*, 22, 2384-401.
- ANDRES-COLAS, SANCENON, RODRIGUEZ-NAVARRO, MAYO, THIELE, ECKER, PUIG und PENARRUBIA 2006. The Arabidopsis heavy metal P-type ATPase HMA5 interacts with metallochaperones and functions in copper detoxification of roots. *Plant J*, 45, 225-36.
- ATTALLAH, WELCHEN, MARTIN, SPINELLI, BONNARD, PALATNIK und GONZALEZ 2011. Plants contain two SCO proteins that are differentially involved in cytochrome c oxidase function and copper and redox homeostasis. *J Exp Bot*, 62, 4281-94.
- BALANDIN und CASTRESANA 2002. AtCOX17, an Arabidopsis homolog of the yeast copper chaperone COX17. *Plant Physiol*, 129, 1852-7.
- BAUR und YANG 1972. Methionine metabolism in apple tissue in relation to ethylene biosynthesis. *Phytochemistry*, 11, 3207-3214.
- BERLETH, BERLETH, MINGES, HANSCH, BURKART, STORK, STAHL, WEIDTKAMP-PETERS, SIMON und GROTH 2019. Molecular Analysis of Protein-Protein Interactions in the Ethylene Pathway in the Different Ethylene Receptor Subfamilies. *Front Plant Sci*, 10, 726.
- BINDER, RODRIGUEZ und BLEECKER 2010. The copper transporter RAN1 is essential for biogenesis of ethylene receptors in Arabidopsis. *J Biol Chem*, 285, 37263-70.
- BISSON, BLECKMANN, ALLEKOTTE und GROTH 2009. EIN2, the central regulator of ethylene signalling, is localized at the ER membrane where it interacts with the ethylene receptor ETR1. *Biochem J*, 424, 1-6.
- BISSON und GROTH 2015. Targeting Plant Ethylene Responses by Controlling Essential Protein-Protein Interactions in the Ethylene Pathway. *Mol Plant*, 8, 1165-74.
- BISSON, KESSENBROCK, MULLER, HOFMANN, SCHMITZ, CRISTESCU und GROTH 2016. Peptides interfering with protein-protein interactions in the ethylene signaling pathway delay tomato fruit ripening. *Sci Rep*, 6, 30634.
- BLABY-HAAS, PADILLA-BENAVIDES, STUBE, ARGUELLO und MERCHANT 2014. Evolution of a plant-specific copper chaperone family for chloroplast copper homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, E5480-7.
- BLECKMANN, WEIDTKAMP-PETERS, SEIDEL und SIMON 2010. Stem cell signaling in Arabidopsis requires CRN to localize CLV2 to the plasma membrane. *Plant Physiol*, 152, 166-76.
- BRASH und DAVIDSON 1976. Adsorption on glass and polyethylene from solutions of fibrinogen and albumin. *Thrombosis Research*, 9, 249-259.
- BROUN und MAYAK 1981. Aminooxyacetic acid as an inhibitor of ethylenesynthesis and senescence in carnation flowers. *Scientia Horticulturae*, 15, 277-282.
- BURG und BURG 1962. Role of Ethylene in Fruit Ripening. *Plant Physiol*, 37, 179-89.

- BURG und BURG 1967. Molecular requirements for the biological activity of ethylene. *Plant Physiol*, 42, 144-52.
- CHAIGNON, MALTA und HINSINGER 2002. Fe-deficiency increases Cu acquisition by wheat cropped in a Cu-contaminated vineyard soil. *New Phytologist*, 154.
- CHANG, KWOK, BLEECKER und MEYEROWITZ 1993. Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. *Science*, 262, 539-44.
- CHANG und STADLER 2001. Ethylene hormone receptor action in Arabidopsis. *Bioessays*, 23, 619-27.
- CHANG, ZHONG, WEIRAUCH, HON, PELIZZOLA, LI, HUANG, SCHMITZ, URICH, KUO, NERY, QIAO, YANG, JAMALI, CHEN, IDEKER, REN, BAR-JOSEPH, HUGHES und ECKER 2013. Temporal transcriptional response to ethylene gas drives growth hormone cross-regulation in Arabidopsis. *Elife*, 2, e00675.
- CHAPMAN und SCHOPF 1983. Biological and biochemical effects of the development of an aerobic environment. In: SCHOPF (ed.) *Earth's Earliest Biosphere: Its Origin and Evolution*. Princeton University Press: Princeton, NJ.
- CHAPPELL, HAHNBROCK und BOLLER 1984. Rapid induction of ethylene biosynthesis in cultured parsley cells by fungal elicitor and its relationship to the induction of phenylalanine ammonia-lyase. *Planta*, 161, 475-80.
- CHEN, RAJAGOPALA, STELLBERGER und UETZ 2010. Exhaustive benchmarking of the yeast two-hybrid system. *Nat Methods*, 7, 667-8; author reply 668.
- CHEN, RANDLETT, FINDELL und SCHALLER 2002. Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of Arabidopsis. *J Biol Chem*, 277, 19861-6.
- CLARK, LARSEN, WANG und CHANG 1998. Association of the Arabidopsis CTR1 Raf-like kinase with the ETR1 and ERS ethylene receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 5401-6.
- COBBETT 2000. Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Curr Opin Plant Biol*, 3, 211-6.
- COBBETT und GOLDSBROUGH 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol*, 53, 159-82.
- DEL POZO, CAMBIAZO und GONZALEZ 2010. Gene expression profiling analysis of copper homeostasis in Arabidopsis thaliana. *Biochem Biophys Res Commun*, 393, 248-52.
- ECKER 1995. The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science*, 268, 667-75.
- FEI, REN, ZARO und SHEN 2011. The influence of net charge and charge distribution on cellular uptake and cytosolic localization of arginine-rich peptides. *J Drug Target*, 19, 675-80.
- FLEGALI, RIVERA-DUARTE und SAÑUDO-WILHELMY 1997. Silver Contamination in Aquatic Environments. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 148, 139-162.
- FLORES und UNGER 2013. Atox1 contains positive residues that mediate membrane association and aid subsequent copper loading. *J Membr Biol*, 246, 903-13.
- FREEDMAN, CIRIOLO und PEISACH 1989. The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *J Biol Chem*, 264, 5598-605.
- GARCIA, WELCHEN und GONZALEZ 2014. Mitochondria and copper homeostasis in plants. *Mitochondrion*, 19 Pt B, 269-74.
- GREFFEN, STADELE, RUZICKA, OBRDLIK, HARTER und HORAK 2008. Subcellular localization and in vivo interactions of the Arabidopsis thaliana ethylene receptor family members. *Mol Plant*, 1, 308-20.
- GUO, MEETAM und GOLDSBROUGH 2008. Examining the specific contributions of individual Arabidopsis metallothioneins to copper distribution and metal tolerance. *Plant Physiol*, 146, 1697-706.

- GUZMAN und ECKER 1990. Exploiting the triple response of Arabidopsis to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell*, 2, 513-23.
- HAO, OHME-TAKAGI und SARAI 1998. Unique mode of GCC box recognition by the DNA-binding domain of ethylene-responsive element-binding factor (ERF domain) in plant. *J Biol Chem*, 273, 26857-61.
- HARRIS und PERCIVAL 1991. A role for ascorbic acid in copper transport. *Am J Clin Nutr*, 54, 1193S-1197S.
- HARRISON, JONES und DAMERON 1999. Copper chaperones: function, structure and copper-binding properties. *J Biol Inorg Chem*, 4, 145-53.
- HIMELBLAU, MIRA, LIN, CULOTTA, PENARRUBIA und AMASINO 1998. Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene ATX1 from Arabidopsis. *Plant Physiol*, 117, 1227-34.
- HIRAYAMA und ALONSO 2000. Ethylene captures a metal! Metal ions are involved in ethylene perception and signal transduction. *Plant Cell Physiol*, 41, 548-55.
- HIRAYAMA, KIEBER, HIRAYAMA, KOGAN, GUZMAN, NOURIZADEH, ALONSO, DAILEY, DANCIS und ECKER 1999. RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in Arabidopsis. *Cell*, 97, 383-93.
- IQBAL, TRIVELLINI, MASOOD, FERRANTE und KHAN 2013. Current understanding on ethylene signaling in plants: the influence of nutrient availability. *Plant Physiol Biochem*, 73, 128-38.
- JAIN, WILSON und CONNOLLY 2014. The diverse roles of FRO family metalloredutases in iron and copper homeostasis. *Front Plant Sci*, 5, 100.
- JU, YOON, SHEMANSKY, LIN, YING, CHANG, GARRETT, KESSENBROCK, GROTH, TUCKER, COOPER, KIEBER und CHANG 2012. CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 19486-91.
- KEHRER 2000. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149, 43-50.
- KLAUMANN, NICKOLAUS, FURST, STARCK, SCHNEIDER, EKKEHARD NEUHAUS und TRENTMANN 2011. The tonoplast copper transporter COPT5 acts as an exporter and is required for interorgan allocation of copper in Arabidopsis thaliana. *New Phytol*, 192, 393-404.
- KLEIN, FIEBIG, NEUWALD, DLUHOSCH, MULLER, GROTH, NOGA und HUNSCHE 2019. Influence of the ethylene-related signal-inhibiting octapeptide NOP-1 on postharvest ripening and quality of 'Golden Delicious' apples. *J Sci Food Agric*, 99, 3903-3909.
- KNIGHT, ROSE und CROCKER 1910. Effects of various gases and vapors upon etiolated seedlings of the sweet pea. *Science*, 311, 635-636.
- KRISTENSEN, HENRIKSEN und ANDRESEN 2015. Adsorption of cationic peptides to solid surfaces of glass and plastic. *PLoS One*, 10, e0122419.
- LAMB, WERNIMONT, PUFAHL, CULOTTA, O'HALLORAN und ROSENZWEIG 1999. Crystal structure of the copper chaperone for superoxide dismutase. *Nat Struct Biol*, 6, 724-9.
- LANDIS und TOWER 2005. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech Ageing Dev*, 126, 365-79.
- LESZCZYSZYN, IMAM und BLINDAUER 2013. Diversity and distribution of plant metallothioneins: a review of structure, properties and functions. *Metallomics*, 5, 1146-69.

- LI, IQBAL, ZHANG, SPELT, BLIEK, HAKVOORT, QUATTROCCHIO, KOES und SCHAT 2017a. Two *Silene vulgaris* copper transporters residing in different cellular compartments confer copper hypertolerance by distinct mechanisms when expressed in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol*, 215, 1102-1114.
- LI, LACEY, YE, LU, YEH, XIAO, LI, WEN, BINDER und ZHAO 2017b. Triplin, a small molecule, reveals copper ion transport in ethylene signaling from ATX1 to RAN1. *PLoS Genet*, 13, e1006703.
- LIGHT, WISNIEWSKI, VINYARD und KIEBER-EMMONS 2016. Perception of the plant hormone ethylene: known-knowns and known-unknowns. *J Biol Inorg Chem*, 21, 715-28.
- MALASARN, KROPAT, HSIEH, FINAZZI, CASERO, LOO, PELLEGRINI, WOLLMAN und MERCHANT 2013. Zinc deficiency impacts CO₂ assimilation and disrupts copper homeostasis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem*, 288, 10672-83.
- MASUDA, YAMAMOTO, TAGA, MACHIDA, KITAGAWA und MUNAKATA 1987. Structural studies of copper(I) complexes with ethylene. Crystal structures of [Cu(2,2'-bipyridine)(ethylene)]ClO₄ and [Cu(1,10-phenanthroline)(ethylene)]ClO₄. *Journal of Organometallic Chemistry*, 322.
- MAUCH, HADWIGER und BOLLER 1984. Ethylene: Symptom, Not Signal for the Induction of Chitinase and beta-1,3-Glucanase in Pea Pods by Pathogens and Elicitors. *Plant Physiol*, 76, 607-11.
- MCDANIEL und BINDER 2012. ethylene receptor 1 (*etr1*) Is Sufficient and Has the Predominant Role in Mediating Inhibition of Ethylene Responses by Silver in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 287, 26094-103.
- MICHENER 1935. Effects of Ethylene on Plant Growth Hormone. *Science*, 82, 551-2.
- MILIC, DICK, MULNAES, PFLEGER, KINNEN, GOHLKE und GROTH 2018. Recognition motif and mechanism of ripening inhibitory peptides in plant hormone receptor ETR1. *Sci Rep*, 8, 3890.
- MIRA, MARTINEZ-GARCIA und PENARRUBIA 2001a. Evidence for the plant-specific intercellular transport of the *Arabidopsis* copper chaperone CCH. *Plant J*, 25, 521-8.
- MIRA, SANCENÓN und PEÑARRUBIA 2002. Copper Homeostasis in Plants. *Handbook of Copper Pharmacology and Toxicology*, Humana Press.
- MIRA, VILAR, ESTEVE, MARTINELL, KOGAN, GIRALT, SALOM, MINGARRO, PENARRUBIA und PEREZ-PAYA 2004. Ionic self-complementarity induces amyloid-like fibril formation in an isolated domain of a plant copper metallochaperone protein. *BMC Struct Biol*, 4, 7.
- MIRA, VILAR, PEREZ-PAYA und PENARRUBIA 2001b. Functional and conformational properties of the exclusive C-domain from the *Arabidopsis* copper chaperone (CCH). *Biochem J*, 357, 545-9.
- NELJUBOW 1901. Über die Horizontale Nutation der Stengel von *Pisum sativum* und einiger anderer Pflanzen.: Beih Botanische Zentralbibliothek.
- PALMITER 1998. The elusive function of metallothioneins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 8428-30.
- PALUMAA 2013. Copper chaperones. The concept of conformational control in the metabolism of copper. *FEBS Lett*, 587, 1902-10.
- PALUMAA, KANGUR, VORONOVA und SILLARD 2004. Metal-binding mechanism of Cox17, a copper chaperone for cytochrome c oxidase. *Biochem J*, 382, 307-14.
- PETRIS, MERCER, CULVENOR, LOCKHART, GLEESON und CAMAKARIS 1996. Ligand-regulated transport of the Menkes copper P-type ATPase efflux pump from the

- Golgi apparatus to the plasma membrane: a novel mechanism of regulated trafficking. *EMBO J*, 15, 6084-95.
- PORTNOY, ROSENZWEIG, RAE, HUFFMAN, O'HALLORAN und CULOTTA 1999. Structure-function analyses of the ATX1 metallochaperone. *J Biol Chem*, 274, 15041-5.
- PRINTZ, LUTTS, HAUSMAN und SERGEANT 2016. Copper Trafficking in Plants and Its Implication on Cell Wall Dynamics. *Front Plant Sci*, 7, 601.
- PUIG, MIRA, DORCEY, SANCENON, ANDRES-COLAS, GARCIA-MOLINA, BURKHEAD, GOGOLIN, ABDEL-GHANY, THIELE, ECKER, PILON und PENARRUBIA 2007. Higher plants possess two different types of ATX1-like copper chaperones. *Biochem Biophys Res Commun*, 354, 385-90.
- QIAO, CHANG, YAZAKI und ECKER 2009. Interplay between ethylene, ETP1/ETP2 F-box proteins, and degradation of EIN2 triggers ethylene responses in Arabidopsis. *Genes Dev*, 23, 512-21.
- RAE, SCHMIDT, PUFAHL, CULOTTA und O'HALLORAN 1999. Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science*, 284, 805-8.
- RIDGE, ZHANG und GLADYSHEV 2008. Comparative genomic analyses of copper transporters and cuproproteomes reveal evolutionary dynamics of copper utilization and its link to oxygen. *PLoS One*, 3, e1378.
- ROBINSON, PROCTER, CONNOLLY und GUERINOT 1999. A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature*, 397, 694-7.
- ROSENZWEIG, HUFFMAN, HOU, WERNIMONT, PUFAHL und O'HALLORAN 1999. Crystal structure of the Atx1 metallochaperone protein at 1.02 Å resolution. *Structure*, 7, 605-17.
- SAKAI, HUA, CHEN, CHANG, MEDRANO, BLEECKER und MEYEROWITZ 1998. ETR2 is an ETR1-like gene involved in ethylene signaling in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 5812-7.
- SAVIN, BAUDINETTE, GRAHAM, MICHAEL, NUGENT, LU, CHANDLER und CORNISH 1995. Antisense ACC Oxidase RNA Delays Carnation Petal Senescence. *HortScience*, 30, 970-972.
- SCHALLER und BLEECKER 1995. Ethylene-binding sites generated in yeast expressing the Arabidopsis ETR1 gene. *Science*, 270, 1809-11.
- SCHALLER, LADD, LANAHAAN, SPANBAUER und BLEECKER 1995. The ethylene response mediator ETR1 from Arabidopsis forms a disulfide-linked dimer. *J Biol Chem*, 270, 12526-30.
- SCHMÖGER. 2000. *Phytochelatine, Komplexierung von Metallen und Metalloiden, Untersuchungen zur Phytochelat-Synthase*. Dr. rer. Nat., Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt.
- SCHOTT-VERDUGO, MULLER, CLASSEN, GOHLKE und GROTH 2019. Structural Model of the ETR1 Ethylene Receptor Transmembrane Sensor Domain. *Sci Rep*, 9, 8869.
- SHAHBAZ, RAVET, PEERS und PILON 2015. Prioritization of copper for the use in photosynthetic electron transport in developing leaves of hybrid poplar. *Front Plant Sci*, 6, 407.
- SHIKANAI, MULLER-MOULE, MUNEKAGE, NIYOGI und PILON 2003. PAA1, a P-type ATPase of Arabidopsis, functions in copper transport in chloroplasts. *Plant Cell*, 15, 1333-46.
- SHIN, LO und YEH 2012. Copper chaperone antioxidant protein1 is essential for copper homeostasis. *Plant Physiol*, 159, 1099-110.
- SISLER und BLANKENSHIP. 1996. *Methods of counteracting an ethylene response in plants*. USA patent application.

- TAPKEN, RAVET und PILON 2012. Plastocyanin controls the stabilization of the thylakoid Cu-transporting P-type ATPase PAA2/HMA8 in response to low copper in Arabidopsis. *J Biol Chem*, 287, 18544-50.
- THOMINE, WANG, WARD, CRAWFORD und SCHROEDER 2000. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in Arabidopsis with homology to Nramp genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 4991-6.
- VEEN und GEIJN 1978. Mobility and ionic form of silver as related to longevity of cut carnations. *Planta*, 140, 93-96.
- WANG, LIU, LI, SUN, HU, LI, ZHAO, HAN, ZHANG, DUAN, LIU und LI 2007. Arabidopsis EIN2 modulates stress response through abscisic acid response pathway. *Plant Mol Biol*, 64, 633-44.
- WATERS, MCINTURF und STEIN 2012. Rosette iron deficiency transcript and microRNA profiling reveals links between copper and iron homeostasis in Arabidopsis thaliana. *J Exp Bot*, 63, 5903-18.
- YUAN, LI, XIAO und WANG 2011. Molecular and functional analyses of COPT/Ctr-type copper transporter-like gene family in rice. *BMC Plant Biol*, 11, 69.
- ZHANG, CHEN, ZHAO, SUN, JIN, SHI, SUN, LI, YANG, JING, LUO und LIAN 2018. OsATX1 Interacts with Heavy Metal P1B-Type ATPases and Affects Copper Transport and Distribution. *Plant Physiol*, 178, 329-344.
- ZHENG und ZHU 2016. Relaying the Ethylene Signal: New Roles for EIN2. *Trends Plant Sci*, 21, 2-4.
- ZIMMERMANN, CLARKE, GULBIS, KEIZER, JARVIS, COBBETT, HINDS, XIAO und WEDD 2009. Metal binding affinities of Arabidopsis zinc and copper transporters: selectivities match the relative, but not the absolute, affinities of their amino-terminal domains. *Biochemistry*, 48, 11640-54.

8 Abkürzungsverzeichnis

μ	micro
1-AVG	1-Aminoethoxyvinylglycin
1-MCP	1-Methylcyclopropen
ACC	1-Aminocyclopropan-1-carboxylat
Ag	Silber
AOA	Aminooxyessigsäure
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATX1	<i>Copper transport protein ATX1</i>
BiFC	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation
CCH	<i>Copper transport protein CCH</i>
CCS	Kupferchaperon für Superoxiddismutase
CEND	<i>C-terminal end of EIN2</i>
COPT	<i>Copper transporter</i>
COX	Cytochrom-c-Oxidase
Cox17	<i>Cytochrome c oxidase copper chaperone</i>
CSD	Chloroplastidäre Superoxiddismutase
CTR1	CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1
Cu	Kupfer
Da	Kilodalton
Dc	<i>Dianthus caryophyllus</i>
EBF1/2	<i>Ethylene binding F-box 1/2</i>
EIL3	ETHYLENE INSENSITIVE 3-like 3 protein
EIN2	<i>Ethylene insensitive protein 2</i>
EIN3	Protein ETHYLENE INSENSITIVE 3
ERF1/2	<i>Ethylene response factor 1/2</i>
ERS1	<i>Ethylene response sensor 1</i>
ETP1/2	<i>Ethylene targeting protein 1/2</i>
ETR1	<i>Ethylene receptor 1</i>
Fe	Eisen
g	Gramm
GAF	cGMP-spezifisch, Phosphodiesterase, Adenylcyclase und FhlA
GSH	Glutathion (red.)
GSSG	Diglutathion (ox.)
HMA	<i>Heavy metal ATPase</i>
k	kilo
l	Liter
m	mili
M	Molar (mol/l)
Mn	Mangan
MST	<i>Microscale Thermophorese</i>
MT	Metallothioneine
NOP-1	<i>NLS-derived Octapeptide 1</i>
NRAMP	<i>Natural resistance-associated macrophage protein</i>

Os	Oryza sativa
PAA1/2	<i>P-Type ATPase of Arabidopsis 1/2</i>
PC	Plastocyanin
PC	Phosphatidylcholin
PCH1	<i>Plastid Chaperone 1</i>
PC _n	Phytochelatine
PiP	Phosphatidylinositol
PS	Phosphatidylserin
PSI	Photosystem I
RAN1	RESPONSIVE TO ANTAGONIST 1
roGFP	<i>redox-sensitive GFP</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SAM	S-Adenosylmethionin
SOD	Superoxiddismutase
u. a.	unter anderem
Y2H	Yeast Two Hybrid
z. B.	zum Beispiel
Zn	Zink

9 Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Prof. Groth für die Bereitstellung des interessanten und vielfältigen Themas bedanken, das mir entgegengebrachte Vertrauen und die stets offene Tür, auch wenn es mal nicht um Wissenschaft ging. Vielen Dank für alles!

Vielen Dank auch an Prof. Rüdiger Simon für die Übernahme des Zweitgutachtens, sowie die anregenden Diskussionen, Ideen und Anmerkungen.

Dr. Stefanie Weidtkamp-Peters danke ich für die Betreuung, während der Promotion und die Einführung in die Konfokalmikroskopie. Mein Dank gilt auch dem restlichen CAi-Team.

Lena, ohne dich wäre es nur halb so schön gewesen. Durch dich hab' ich gelernt, dass es nicht viel gibt, dass nicht nach er einer frischen Tasse Kaffee besser ist. Auch wenn uns die Köpfe manchmal geraucht haben, geteiltes Leid ist halbes Leid.

Ich danke auch dem restlichen Institut für die wirklich schöne Zeit. Kerstin und Nici, ihr seid wie die guten Elfen des Labors, die Mamis, die immer eine Antwort kennen. Dominik² und Alex² ich danke euch für die vielen (un)wissenschaftlichen Diskussionen, den Rat und auch für die lustigen Momente.

Ich danke dem SFB1208, insbesondere Prof. Schmitt und Dr. Cordula Kruse, für die wundervolle Wissenschaft, die ich durch eine Promotion im Rahmen des Sonderforschungsbereiches kennenlernen durfte.

Lieber Jan, ich danke dir für deine Unterstützung während der letzten Jahre. Auf dich ist immer Verlass und du lässt dich durch nichts (und niemanden) aus der Ruhe bringen.

Ich danke meiner Familie, die alles möglich macht. Mama, du unterstützt mich immer und lebst mir Stärke vor. Gabi, Laura, Bella und Lori, ihr seid mein Hoppen'scher Hühnerhaufen, mit euch an der Seite kann man alles durchstehen. Lenny du hältst mich jung und erinnerst mich daran wie es war die Welt mit Kinderaugen zu sehen.

Papa, wie gerne würde ich diesen Moment mit dir teilen können. Ich danke dir für mein erstes „Labor“, die Neugier, die du in mir geweckt hast, das gute Gedächtnis, dass ich nur von dir haben kann, und die lieben Worte die du mir noch mitgegeben hast. Du fehlst uns.

Lieber Herr Pfeiffer, ich danke Ihnen für die Erstausrüstung meines kleinen Forscherlabors. Ich habe alles gut verpackt und hoffe diese auch mal in gute Hände abgeben zu können.

David, Jan und Lena euch vielen Dank für die vielen wertvollen Anmerkungen. Ich hoffe ihr seid an meiner Kommasetzung nicht verzweifelt.

10 Eidesstattliche Erklärung

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

Ort, Datum

Claudia Hoppen