

**Strukturelle Analyse von Kupferchaperonen
und Komplexen des Ethylenrezeptors ETR1 mit
Kupferchaperon-ähnlichen Proteinen aus
*Arabidopsis thaliana***

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Dominik Dluhosch
aus Düsseldorf

Düsseldorf, März 2025

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

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

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Georg Groth

2. Prof. Dr. Lutz Schmitt

Tag der mündlichen Prüfung: 25.06.2025

Abstract

Ethylene represents the simplest alkene and functions as a plant hormone, which influences a variety of developmental processes such as plant growth or fruit ripening. This gaseous molecule is perceived by a group of integral membrane-proteins (receptors) at the endoplasmic reticulum (ER), which require a Cu(I)-cofactor for their function. This cofactor is located in the receptors transmembrane domain (TMD). Due to the ability of copper ions to undergo a redox cycle within cells and thereby catalyze the formation of reactive oxygen species (ROS), these Cu(I)-ions are not present in free form within the cell but are bound to small proteins, so-called copper chaperones. Among other small copper binding ligands, these copper chaperones safely transport their cargo to their molecular target. Little is known on how exactly ethylene receptors obtain this copper cofactor, but both the copper chaperones ATX1 and CCH as well as the P_{1B}-type ATPase RAN1, which is also localized in the membrane of the ER, are involved in this process and RAN1 has been shown to be essential for the biogenesis of the receptors. In contrast to ATX1, CCH is only present in plants and contains an additional C-terminal domain whose function is yet unknown.

In this work, it was demonstrated that this domain is intrinsically disordered in the full-length protein and that this domain is neither involved in the binding of Cu(I)-ions, nor that the binding of copper to CCH causes a change to the structure of the C-terminal domain. However, this additional domain influences the dimerization behavior of CCH, so that the K_D -value for the dimerization of CCH is lower by a factor of 2-3 compared to the deletion mutant CCH Δ , which does not contain this C-terminal domain. This stabilizing effect is also evident by the significantly increased melting temperature of CCH compared to the deletion mutant CCH Δ , lacking this domain. Based on molecular dynamics (MD)-simulations, this is probably due to additional interactions of the C-terminus with the N-terminal, Cu(I)-binding domain. The C-terminus itself however, is not involved in the binding of Cu(I)-ions. These observations are consistent with the assumption of an intercellular copper transport mediated by CCH, as these properties support a safe long-distance transport of copper.

Furthermore, it was shown in this work that in addition to the two known MBDs, another domain featuring the ATX1-like fold but not the Cu(I)-binding motif, is localized in the N-terminus of RAN1. The tertiary structure of this domain was determined/confirmed by X-ray crystallography. Interaction studies based on microscale thermophoresis (MST) demonstrated that the affinity of the RAN1-MBDs for ATX1 is 10-20 times higher than for CCH. In this work, it was further shown that all three MBDs of RAN1 bind to ETR1 with similar affinities. For all interactions, an orientation of the copper chaperones and MBDs was predicted by bioinformatic methods, so that a transfer of copper from the copper chaperones to the MBDs as well as from

the MBDs to the TMD of ETR1 seems theoretically possible. According to the mechanism/model proposed in this work, MBD3 serves to stabilize the ETR1-RAN1 complex, MBD1 receives copper from ATX1 and transfers it to MBD2, and MBD2 subsequently transfers copper to the TMD of ETR1. The model proposed here serves as a basis for future experiments to gain additional insights into the copper transfer to the ETRs and to identify amino acids that are relevant for the transfer of copper into the ETR1 TMD.

Zusammenfassung

Bei Ethylen handelt es sich um das einfachste Alken, welches in Pflanzen als Hormon fungiert und eine Reihe von Entwicklungsprozessen, wie z.B. das pflanzliche Wachstum oder die Fruchtreife beeinflusst. Wahrgenommen wird dieses gasförmige Molekül durch eine Gruppe von membranständigen Rezeptoren im Endoplasmatischen Retikulum (ER), welche für ihre Funktion einen Cu(I)-Kofaktor in ihrer Transmembrandomäne (TMD) benötigen. Aufgrund der Fähigkeit von freien Kupfer-Ionen innerhalb der Zelle einen Redoxzyklus zu durchlaufen und dabei die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu katalysieren, liegen diese innerhalb der Zelle nicht in freier Form vor, sondern sind an kleine Proteine, sogenannte Kupferchaperone, gebunden und werden von diesen zu ihrem Bestimmungsort transportiert. Wie genau Ethylenrezeptoren diesen Kofaktor erhalten, ist nur wenig untersucht, jedoch sind sowohl die Kupferchaperone ATX1 und CCH sowie die ebenfalls in der Membran des ER lokalisierte P_{1B}-Typ ATPase RAN1 an diesem Prozess beteiligt. Dabei ist RAN1 essentiell für die Biogenese der Rezeptoren. Eine Besonderheit von CCH ist, dass dieses nur in Pflanzen vorkommt und im Gegensatz zu ATX1 eine zusätzliche, C-terminale Domäne aufweist, deren Funktion ungeklärt ist.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese Domäne im Volllängen-Protein intrinsisch ungeordnet und weder an der Bindung von Cu(I)-Ionen beteiligt ist, noch dass die Bindung von Kupfer an CCH eine Änderung in der Struktur der C-terminalen Domäne bewirkt. Diese zusätzliche Domäne beeinflusst jedoch das Dimerisierungsverhalten von CCH, sodass der K_D -Wert für die Dimerisierung von CCH im Vergleich zur Deletionsmutante CCH Δ , welche diese C-terminale Domäne nicht enthält, um den Faktor 2-3 geringer ist. Dieser stabilisierende Effekt konnte auch durch eine signifikant erhöhte Schmelztemperatur von CCH gegenüber CCH Δ nachgewiesen werden und ist, basierend auf MD-Simulationen, wahrscheinlich auf zusätzliche Interaktionen von Aminosäureseitenketten des C-Terminus mit der N-terminalen, Cu(I)-bindenden Domäne zurückzuführen. Der C-Terminus selbst ist dabei aber nicht an der Bindung der Cu(I)-Ionen beteiligt. Diese Beobachtungen sind in Einklang mit der Vermutung eines interzellulären Kupfertransports durch CCH, da durch diese Eigenschaften ein sicherer Langstreckentransport von Kupfer ermöglicht wird.

Ferner konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass im N-Terminus von RAN1 neben den zwei bekannten MBDs eine weitere Domäne lokalisiert ist, welche eine ATX1-ähnliche Faltung, jedoch nicht das Cu(I)-bindende Motiv aufweist. Die Tertiärstruktur dieser Domäne konnte in dieser Arbeit mittels Röntgenstrukturanalyse bestimmt bzw. bestätigt werden. Durch Interaktionsstudien basierend auf *Microscale Thermophoresis* (MST) konnte gezeigt werden, dass die Affinität der RAN1-MBDs für ATX1 10-20x höher ist, als für CCH. Ebenso konnte gezeigt werden, dass alle drei MBDs von RAN1 mit ähnlicher Affinität an ETR1 binden. Für

alle Interaktionen wurde mittels bioinformatischer Methoden und mit Ausnahme von MBD3, eine Orientierung der Kupferchaperone und MBDs vorhergesagt, welche einen Transfer des Metallions von den Kupferchaperonen auf die MBDs, als auch von den MBDs auf die TMD von ETR1 theoretisch zulassen. Nach dem in dieser Arbeit vorgeschlagenen Mechanismus dient MBD3 der Stabilisierung des ETR1-RAN1-Komplexes, MBD1 nimmt Kupfer von ATX1 auf und überträgt dieses auf MBD2 und MBD2 überträgt anschließend Kupfer auf die TMD von ETR1. Das hier vorgeschlagene Modell dient als Grundlage für künftige Experimente, mittels welchen sich weitere Einblicke in den Kupfertransfer zu den ETRs gewinnen lassen und (potentiell) relevante Aminosäuren für den Transfer von Kupfer in die ETR1 TMD identifiziert werden können.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	I
Zusammenfassung	III
Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	10
1.1 Eigenschaften von Kupfer	10
1.2 Koordination von Kupfer-Ionen in Proteinen	11
1.3 Kupfer in Pflanzen	12
1.3.1 Aufnahme und Distribution von Kupfer in Pflanzen.....	14
1.3.2 Intrazellulärer Kupfertransport – Kupferchaperone und Peptide	16
1.3.3 Funktion von P-Typ ATPasen als Kupfertransporter.....	22
1.3.4 Aufbau von kupfertransportierenden P _{1B} -Typ ATPasen.....	25
1.4 Ethylen als Phytohormon.....	28
1.4.1 Funktion von Ethylen als Phytohormon	28
1.4.2 Der Ethylensignalweg – Signaltransduktion und Komponenten.....	29
1.4.3 Ethylenrezeptoren – Aufbau und Funktion.....	31
2 Zielsetzung	34
3 Ergebnisse	36
3.1 Struktur und Dimerisierungseigenschaften des pflanzenspezifischen Kupferchaperons CCH	36
3.2 Molekularer Mechanismus und strukturelle Modelle des Protein-vermittelten Kupfertransfers zum <i>Arabidopsis thaliana</i> Ethylenrezeptor ETR1 an der ER-Membran.....	64
4 Diskussion	116
4.1 CCH enthält eine intrinsisch ungeordnete Domäne mit multiplen Funktionen	116
4.2 Strukturelle Aspekte des Kupfertransfers zum Ethylenrezeptor ETR1	123
4.3 Mechanismus des proteinvermittelten Kupfertransfers zum Ethylenrezeptor ETR1 an der ER-Membran.....	127
5 Literatur	132
6 Danksagung	146
7 Erklärung	147

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Varianzanalyse (<i>Analysis Of Variance</i>)
ATOX1	<i>Antioxidant 1</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATPBD	ATP-Bindende Domäne (<i>ATP-Binding Domain</i>)
ATX1	<i>Antioxidant Protein 1</i>
BCA	Bicinchoninsäure (<i>Bicinchoninic Acid</i>)
BCS	Bathocuproindisulfonsäure
BEST-TROSY	<i>Band-Selective Excitation Short-Transient-Transverse Relaxation-Optimized Spectroscopy</i>
BLI	<i>Bio-Layer Interferometry</i>
CBM	Kupferbindendes Motiv (<i>Copper Binding Motif</i>)
CCH	<i>Copper Chaperone</i>
CCP	<i>Copper Chaperone Induced By Pathogens</i>
CCS	<i>Copper Chaperone For Superoxide Dismutase</i>
CD	Circulardichroismus (<i>Circular Dichroism</i>)
COPT#*	<i>Copper Transporter</i>
CopZ	<i>Copper Chaperone Z</i>
COX#*	<i>Cytochrome-C-Oxidase</i>
CSD	Cu/Zn-Superoxid Dismutase
CTR1	<i>Constitutive Triple Response 1</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBF#*	<i>EIN3-Binding F-Box Protein</i>
EIL1	<i>EIN3-Like 1</i>
EIN#*	<i>Ethylene Insensitive</i>
ENAP1	<i>EIN2 Nuclear Associated Protein 1</i>
EPR	Elektronenspinresonanz (<i>Electron Paramagnetic Resonance</i>)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERS#*	<i>Ethylene Response Sensor</i>
ETP#*	<i>EIN2 Targeting Protein</i>
ETR#*	<i>Ethylene Resistant</i>
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
FRO#*	<i>Ferric Reduction Oxidase</i>
GAF	cGMP-Spezifische Phosphodiesterase, Adenylylzyklase Und Fhla

GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GLINTER	<i>Graph Learning Of INTER-Protein Contacts</i>
GPU	<i>Graphics Processing Unit</i>
GSH	Glutathion
HADAMAC	<i>Hadamard-Encoded Amino Acid Type Editing</i>
HADDOCK	<i>High Ambiguity Driven Protein-Protein DOCKing</i>
HAH1	<i>Human ATX1 Homologue</i>
HCC#*	<i>Homologue Of The Copper Chaperone SCO1</i>
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-Ethansulfonsäure
<i>His-tag</i>	<i>Polyhistidine-tag</i>
HMA	<i>Heavy Metal ATPase</i>
HSAB	Harte Und Weiche Säuren Und Basen (<i>Hard And Soft Acids And Bases</i>)
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
ICP-MS	Massenspektrometrie Mit Induktiv Gekoppeltem Plasma (<i>Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry</i>)
ID	<i>Intervening Domain</i>
IDD	<i>Intrinsically Disordered Domain</i>
IDP	<i>Intrinsically Disordered Proteins</i>
IDR	<i>Intrinsically Disordered Region</i>
IMAC	Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatografie (<i>Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography</i>)
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
MBD#*	Metallbindende Domäne (<i>Metal Binding Domain</i>)
MBP	<i>Maltose Binding Protein</i>
MBS	Metallbindestelle (<i>Metal Binding Site</i>)
MCP	Methylcyclopropen
MD	<i>Molecular Dynamics</i>
MDS	<i>Microfluidic Diffusional Sizing</i>
MeBD	Methyl-bindende Domäne
MeCP2	Methyl-CpG Protein 2
MM-GBSA	<i>Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area</i>
MR	Molekularer Ersatz (<i>Molecular Replacement</i>)
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
MSP1E3	<i>Membrane Scaffold Protein 1 Extended 3</i>
MST	<i>Microscale Thermophoresis</i>
NHS-Ester	N-Hydroxysuccinimid-Ester
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>

NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NTD	N-Terminale Domäne
PAA#*	<i>P-Type ATPase Of Arabidopsis</i>
PAB	<i>Poly-Adenylat Binding</i>
PAE	<i>Predicted Alignment Error</i>
PC	Plastocyanin
PCH1	<i>Plastid Chaperone</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pLDDT	<i>Predicted Local Distance Difference Test</i>
Poly-A	Poly-Adenylat
Poly-U	Poly-Uridylat
RAN1	<i>Responsive To Antagonist 1</i>
RISM	<i>3D Reference Interaction Site Mode</i>
RMSD	<i>Root-Mean-Square Deviation</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
s.d.	Standard Deviation
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
SCO#*	<i>Synthesis Of Cytochrome-C-Oxidase</i>
SEC	Größenausschlusschromatographie (<i>Size-Exclusion Chromatography</i>)
SOD#*	Superoxid Dismutase
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
TIP3P	<i>Transferable Intermolecular Potential With 3 Points</i>
TM	Transmembranhelices
TMD	Transmembrandomäne
TOR	<i>Target Of Rapamycin</i>
Tris/HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan Hydrochlorid
TSA	<i>Thermal Shift Assay</i>
UTR	<i>Untranslated Region</i>
UV	Ultraviolett
ZIP	<i>ZRT/IRT-Like Protein</i>

* # stellen Platzhalter für Zahlen dar, wenn mehrere Varianten existieren

Abbildungsverzeichnis

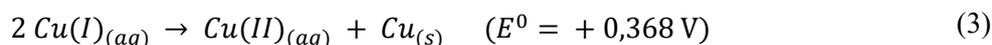
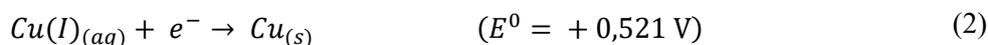
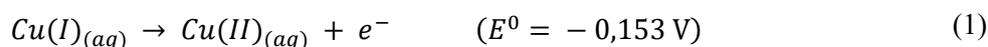
Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Redoxzyklus von freien Kupfer-Ionen innerhalb einer Zelle.....	13
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Austauschs von Cu(I)-Ionen zwischen einem Kupferchaperon und einer regulatorischen Metallbindedomäne einer kupfertransportierenden P-Typ ATPase.	18
Abbildung 1.3: Enzymkatalysierte Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies.	19
Abbildung 1.4: Aufnahme und Distribution von Kupfer in Pflanzen.....	24
Abbildung 1.5: Schematischer Aufbau der kupfertransportierenden P _{1B} -Typ ATPase HMA7/RAN1 und Darstellung des Transportmechanismus.	27
Abbildung 1.6: Der Ethylensignalweg.	31
Abbildung 1.7: Schematischer Vergleich der Ethylenrezeptoren aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	33

1 Einleitung

1.1 Eigenschaften von Kupfer

Kupfer (Cu) ist im Periodensystem der Elemente in der ersten Nebengruppe und somit im sogenannten d-Block aufgeführt. In elementarer Form besitzt Kupfer, anders als das Aufbauprinzip vermuten lässt, eine vollständig besetzte *d*-Unterschale und somit die Elektronenkonfiguration [Ar] 4s¹ 3d¹⁰. Dies wird durch die höhere Stabilität der vollständig besetzten *d*-Unterschale gegenüber der unvollständig besetzten Unterschale erklärt. Es wird zu den Übergangsmetallen gezählt, da es definitionsgemäß Kationen mit einer unvollständig besetzten *d*-Unterschale bilden kann [1]. Im oxidierten Zustand ist Kupfer hauptsächlich in der Cu(I)- oder der Cu(II)-Form anzutreffen, dabei wird zunächst das Elektron aus dem 4s und dann ein Elektron aus einem 3*d*-Orbital abgegeben, sodass Cu(I) die Elektronenkonfiguration [Ar] 3d¹⁰ und Cu(II) [Ar] 3d⁹ besitzt [2]. Diese Elektronenkonfigurationen erklären die unterschiedlichen Eigenschaften wie z.B. Farbigkeit, (bevorzugte) Koordinationsgeometrie, Ligandenpräferenz oder Komplexstabilität [3, 4]. Durch die Bindung von Liganden an Cu-Ionen spalten die *d*-Orbitale abhängig von ihrer Ausrichtung zu den Liganden in verschiedene Energieniveaus auf und sind nicht mehr energetisch gleichwertig (degeneriert) [5, 6]. Da die *d*-Orbitale in Cu(II) nicht vollständig besetzt sind, können so *d-d* Übergänge eines Elektrons aus einem *d*-Orbital in ein höherenergetisches *d*-Orbital durch Absorption von elektromagnetischer Strahlung angeregt werden, wodurch Cu(II)-Komplexe farbig erscheinen. Im Gegensatz dazu erscheinen Komplexe von Cu(I)-Ionen farblos, da dessen 3*d*-Orbitale vollständig besetzt sind. Ausnahmen bilden hier Ladungstransferkomplexe, wie z.B. der intensiv violett gefärbte Komplex von Cu(I) mit Bicinchoninsäure (Cu(I)-BCA₂) [7].

Cu(I) ist in wässrigen Lösungen nicht stabil und disproportioniert zu elementarem Kupfer und Cu(II), weshalb Arbeiten mit einwertigen Kupfer-Ionen in wässrigen Medien eine Stabilisierung dieses Oxidationszustandes durch geeignete Chelatoren erfordern [8]. Zudem besitzt Cu(I) nur eine sehr geringe Löslichkeit in wässrigen Medien, wodurch die Notwendigkeit von Chelatoren weiter unterstrichen wird. Die Disproportionierung von Cu(I) in wässrigen Lösungen kann anhand der Standardredoxpotentiale für die Teil- und Gesamtreaktion erklärt bzw. verdeutlicht werden. Die entsprechenden Reaktionsgleichungen sind nachfolgend dargestellt (Gleichungen 1-3), die Werte sind Referenz [9] entnommen.



Aus E^0 der Disproportionierung (Gleichung 3) kann dann die Änderung der Gibbs-Energie berechnet werden (Gleichung 4). Für positive E , werden negative Werte für ΔG erhalten, was bedeutet, dass die Disproportionierung von Cu(I) thermodynamisch begünstigt ist und es sich bei dieser Reaktion um einen spontan ablaufenden Prozess handelt. Wird z.B. der Wert des Redoxpotentials der Disproportionierung von Kupfer (Gleichung 3) in Gleichung 4 eingesetzt, wird für ΔG ein Wert von -35,5 kJ/mol erhalten.

$$\Delta G = -nFE \quad (4)$$

ΔG = Änderung der Gibbs-Energie

n = Anzahl der Elektronen, die in den Teilreaktionen übertragen werden

F = Faraday-Konstante ($9,649 \times 10^4 \frac{C}{mol}$)

E = Redoxpotential der betrachteten Reaktion

1.2 Koordination von Kupfer-Ionen in Proteinen

Die elektronische Konfiguration eines Metallions beeinflusst neben weiteren Faktoren wie z.B. die Größe des Metallions, die Koordinationsgeometrie und bewirkt, dass bestimmte Koordinationsgeometrien bevorzugt werden. Ebenso können die komplexierenden Liganden den Redoxzustand des gebundenen Metallions beeinflussen, wodurch das Redoxpotential moduliert werden kann. Diese Eigenschaften werden auch von metallbindenden Proteinen ausgenutzt [10-12]. Durch die Wahl und Anzahl der das Metallion komplexierenden Aminosäureseitenketten wird eine hohe Selektivität für das entsprechende Metallion und seine Funktion innerhalb des Proteins erreicht. Auf diese Weise werden Cu(II)-Ionen vorzugsweise quadratisch pyramidal/planar oder axial-verzerrt, oktaedrisch komplexiert [13, 14]. Diese Verzerrung ist eine Folge der d^9 -Elektronenkonfiguration von Cu(II) und wird durch den Jahn-Teller Effekt hervorgerufen, wodurch die Gesamtenergie des Komplexes im Vergleich zum nicht-verzerrten Komplex herabgesenkt wird [15]. In einem Jahn-Teller verzerrten oktaedrischen Cu(II)-Komplex sind die axialen Ligandenbindungen gestreckt [15]. Cu(I) hingegen weist aufgrund seiner d^{10} -Elektronenkonfiguration keine Präferenz für eine bestimmte Koordinationsgeometrie auf und kann in Komplexen mit Koordinationszahlen (Anzahl der Liganden) zwei bis vier vorliegen [9]. Wie bereits erwähnt, existieren nicht nur Präferenzen eines Metallions für bestimmte Koordinationsgeometrien, sondern auch für Liganden. Diese können mit Hilfe des HSAB-Konzepts (*hard and soft acids and bases*) vorhergesagt bzw. abgeschätzt werden [16]. In diesem Konzept wird die Polarisierbarkeit eines Atoms/Ions berücksichtigt und das Metallionen als Lewis-Säure, die Liganden als Lewis-Basen betrachtet. „Harte“ Säuren und Basen weisen eine geringe Größe sowie eine hohe Ladungsdichte auf und sind somit nicht bzw. nur schwer polarisierbar, wohingegen „weiche“

Säuren und Basen leicht polarisierbar sind, was auf ihre Größe und eine geringere Ladungsdichte zurückzuführen ist. Das HSAB-Konzept sagt aus, dass „harte“ Säuren bevorzugt mit „harten“ Basen, „weiche“ Säuren bevorzugt mit „weichen“ Basen und „moderate/grenzwertige“ Säuren bevorzugt mit „moderaten“ Basen Komplexe eingehen. Das Cu(I)-Ion wird aufgrund seiner Größe und geringen Ladungsdichte zu den „weichen“ Lewis-Säuren gezählt und bildet daher bevorzugt Komplexe mit „weichen“ Basen wie z.B. Thiolen, Thiolaten und Thioethern wie sie im biologischen Kontext in den Seitenketten der Aminosäuren Cystein und Methionin vorkommen. Es ist aber auch eine Komplexbildung durch „moderate“ Basen wie dem Imidazolring des Histidins möglich. Die Donor-Atome sind in diesen Beispielen Schwefel und Stickstoff. Dem gegenüber steht das Cu(II)-Ion, welches eine höhere Ladungsdichte und geringere Größe aufweist und daher zu den „moderaten“ Lewis-Säuren gezählt wird. Cu(II) bildet nach dem HSAB-Konzept bevorzugt Komplexe mit „harten“ und „moderaten“ Lewis-Basen wie z.B. Sauerstoff und Stickstoff. Diese existieren im biologischen Kontext z.B. in den funktionellen Gruppen der Seitenketten von Aminosäuren wie Aspartat, Glutamat und Histidin, aber auch eine Komplexbildung mit schwefelhaltige Aminosäuren ist aufgrund des „moderaten“ Lewis-Säure-Charakters möglich.

All diese Eigenschaften werden in biologischen Systemen von spezialisierten Proteinen ausgenutzt, um selektiv Kupfer in der Cu(I) oder Cu(II)-Form zu binden und in der Form zu stabilisieren, die für die Funktion des entsprechenden Proteins erforderlich ist.

1.3 Kupfer in Pflanzen

Kupfer (Cu) zählt neben weiteren Elementen wie z.B. Eisen (Fe) oder Zink (Zn) zu den essentiellen Mikronährstoffen der Pflanze [17]. Da es sich bei diesen Stoffen jedoch um Elemente handelt, können diese von Organismen weder erzeugt, noch abgebaut werden und müssen in löslicher Form aus der Umgebung aufgenommen werden. Kupfer übernimmt eine zentrale Rolle in einer Vielzahl von zellulären und pflanzlichen Entwicklungsprozessen [18-22]. Seine Konzentration in der Pflanze bzw. innerhalb der Zelle sowie das Gleichgewicht mit weiteren Mikronährstoffen unterliegen einer strikten Kontrolle und werden durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener membranständiger und löslicher Kupfertransportproteine reguliert [23-25]. Dazu zählen u.a. die membranständigen Kupfertransporter der COPT/CTR Proteinfamilie sowie die schwermetall-transportierenden HMAs der P-Typ ATPasen und die löslichen Kupferchaperone der ATX1-ähnlichen Proteine [23, 26, 27].

Häufig wird von Organismen in diesem Zusammenhang die Eigenschaft von Kupfer sowohl als Elektronendonator, als auch als Akzeptor zu fungieren ausgenutzt. Diese Eigenschaft stellt

alle Organismen jedoch zugleich vor große Herausforderungen, da Kupfer in höheren Konzentrationen stark toxisch wirkt [19]. In freier Form sind Kupfer-Ionen in der Lage, schädliche reaktive Sauerstoffspezies (ROS) mittels der Haber-Weiss und Fenton-Reaktion zu bilden. Dabei durchläuft das Kupfer-Ion in Gegenwart von Superoxidanionen ($O_2^{\bullet-}$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2), welche in diversen metabolischen Prozessen gebildet werden können, einen Redoxzyklus, in welchem es kontinuierlich zwischen der Cu(I) und Cu(II)-Form wechselt und letztendlich die Bildung des hochreaktiven Hydroxyl-Radikals (OH^{\bullet}) katalysiert [28, 29] (Abbildung 1.1). Dieses stellt ein äußerst starkes Oxidationsmittel dar und kann biologische Makromoleküle wie z.B. DNA, Lipide oder Proteine schädigen, was schließlich zu Mutationen, oxidativem Stress sowie zum Zelltod (Apoptose) führen kann [29, 30].

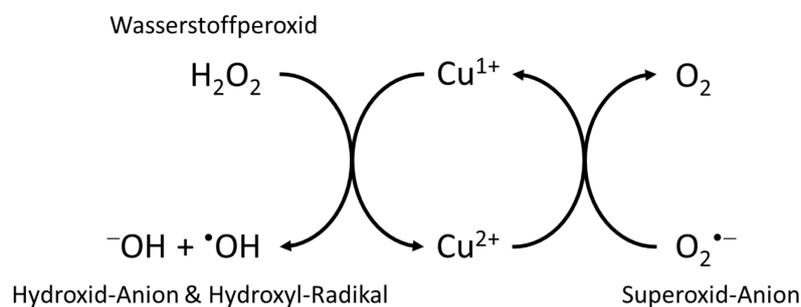


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Redoxzyklus von freien Kupfer-Ionen innerhalb einer Zelle.

Gezeigt sind die Haber-Weiss und Fenton-Reaktionen. In der Zelle sind freie Kupfer-Ionen in der Lage, die Bildung des hochreaktiven Hydroxyl-Radikals zu katalysieren. Dieses starke Oxidationsmittel wirkt schädlich auf die Zelle und stellt daher eine Quelle für oxidativen Stress dar. In dieser Kupfer-katalysierten Reaktion wird zunächst ein Elektron von Kupfer auf Wasserstoffperoxid übertragen, wodurch u.a. das Hydroxyl-Radikal gebildet wird. Anschließend wird das Cu^{1+} -Ion durch Reduktion von Cu^{2+} durch z.B. das Superoxid-Anion regeneriert und der Reaktionszyklus beginnt erneut. Die Superoxid-angetriebene Bildung des Hydroxyl-Radikals wird als Haber-Weiss Reaktion bezeichnet, die Fenton-Reaktion beschreibt die Oxidation des Kupfers und die damit verbundene Reduktion des Wasserstoffperoxids (linker Teil des Zyklus). Superoxid und Wasserstoffperoxid werden als Nebenprodukte verschiedener Stoffwechselreaktionen gebildet. Das Hydroxyl-Radikal, das Superoxid-Anion sowie Wasserstoffperoxid werden aufgrund ihrer hohen Reaktivität auch als reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bezeichnet. Abbildung erstellt mit MS PowerPoint.

Wie bereits zuvor erwähnt, ist Kupfer in Pflanzen am häufigsten im Kontext von Reduktions-Oxidations-Reaktionen, wie sie z.B. in der Photosynthese oder auch in der Atmungskette stattfinden, anzutreffen. In der monovalenten Form ist Kupfer zudem in der Lage, Alkene zu koordinieren. Diese Eigenschaft wird von Pflanzen bei der Wahrnehmung des Phytohormons Ethylen durch spezialisierte Rezeptoren ausgenutzt wird [31]. Somit ist Kupfer direkt an der Wahrnehmung und Vermittlung eines Phytohormons/Signals beteiligt, welches eine Vielzahl von Prozessen in Pflanzen reguliert bzw. in diese eingreift. Diese werden in Kapitel 1.4.1 genauer erläutert.

1.3.1 Aufnahme und Distribution von Kupfer in Pflanzen

In Pflanzen übernimmt Kupfer zentrale Funktionen in Prozessen wie der Photosynthese, Zellatmung, Zellwandlignifizierung, in der Desaktivierung von ROS, Pathogenabwehr, Blütenbildung, Reproduktion und der Hormonwahrnehmung [31-35]. Da es sich bei Kupfer um einen essentiellen und zugleich toxischen Mikronährstoff handelt, wird seine Aufnahme und Verteilung innerhalb der Pflanze und der Zelle strikt reguliert. Konzentrationen ab 20 μM sind bereits ausreichend, um auf die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* toxisch zu wirken [36]. Um von Pflanzen aufgenommen zu werden, muss Kupfer zunächst in löslicher Form vorliegen. In Gegenwart von Sauerstoff liegt Kupfer in der Cu(II)-Form und nahezu vollständig als Komplex mit organischem Material vor, wodurch es nur eine geringe Verfügbarkeit aufweist und zunächst mobilisiert werden muss [37]. Seine Mobilität und somit Verfügbarkeit ist hierbei abhängig vom pH-Wert, mit einer maximalen Adsorption an organisches Material bei pH 7,0 [38]. Die Mobilität nimmt bei pH-Werten unter 4,4 zu, wohingegen die Adsorption und damit eine Abnahme der Mobilität bei pH-Werten über 4,5 zunimmt [39-41].

An der Aufnahme und Homöostase bzw. Distribution von Kupfer sind membranständige Transporter aus verschiedenen Proteinfamilien beteiligt. Dazu zählen u.a. Transporter aus der Familie der *Copper Transporter* (COPT), *Heavy Metal ATPases* (HMAs) sowie evtl. auch aus der *ZRT/IRT-Like Protein* (ZIP)-Familie [26, 42-45]. Sowohl COPTs als auch HMAs sind an der Distribution bzw. Homöostase von Kupfer beteiligt, jedoch werden entgegengesetzte Funktionen für COPTs und HMAs in Bezug auf die Aufnahme von Kupfer angenommen. Aus diesem Grund werden die HMAs separat in Kapitel 1.3.3 beschrieben. Für die Mobilisierung von Kupfer aus der Umgebung wird dieses zunächst von Cu(II) zu Cu(I) reduziert. Die Reduktion erfolgt hierbei durch die Ferrireduktasen FRO4 und FRO5 an der Wurzeloberfläche [24].

In reduzierter Form wird Kupfer dann mittels hochaffiner Transporter der COPT-Protein Familie aufgenommen und an spezifische, cytosolische Metallochaperone bzw. schwefelhaltige Peptide für den weiteren Transport zu den entsprechenden Organellen und Zielproteinen übergeben. In *Arabidopsis* existieren sechs dieser hochaffinen Cu(I) Transporter (COPT1-6) von welchen COPT1, COPT2 und COPT6 in der Plasmamembran und COPT3 und COPT5 in Membranen von Organellen lokalisiert sind [43, 46]. Die subzelluläre Lokalisation von COPT4 ist hingegen nicht bekannt. Alle COPTs haben gemeinsam, dass diese im Gegensatz zu den HMAs für den Transport von Cu(I) kein ATP benötigen. Dass der Transport von Cu(I)-Ionen unabhängig von ATP erfolgt, wurde experimentell anhand des humane COPT-Homologs Ctr1 demonstriert [47, 48].

COPT1 und COPT2 sind direkt an der Aufnahme von Cu(I) in die Wurzel beteiligt und dementsprechend in der Plasmamembran der Wurzelzellen lokalisiert. Es wurde gezeigt, dass

Kupfermangel die Expression von COPT1 und COPT2 induziert bzw. die Expressionslevel dieser Proteine erhöht [24, 26, 49]. COPT6 wird hingegen hauptsächlich in der Vaskulatur von photosynthetisch aktivem Gewebe exprimiert und reguliert dort die Verteilung von Kupfer unter Mangelbedingungen [46, 50]. COPT3 wird ebenso wie COPT6 in vaskularem Gewebe aber auch in frühen Entwicklungsstadien von Pollen exprimiert [51]. Der Verlust der Funktionsfähigkeit von COPT3 führt unter kupferlimitierenden Bedingungen zu Fehlbildungen der Zellwand der Pollen. Weiterhin deutet eine Lokalisationsstudie, in welcher ein Proteinextrakt aus *Arabidopsis*-Blättern durch eine Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt und die erhaltenen Fraktionen mittels Western-Blot analysiert wurden, darauf hin, dass COPT3 im Endomembransystem und dort evtl. in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert sein könnte [52]. COPT4 wird hauptsächlich in der Wurzel exprimiert, ist aber wahrscheinlich nicht direkt an der Cu-Homöostase beteiligt, da diesem u.a. das für den Transport von Cu(I)-Ionen essentielle und in der COPT-Familie konservierte *MxxxM*-Motiv innerhalb der Transmembrandomäne fehlt [26, 53]. COPT5 wird am stärksten in den Leitbündeln des Hypokotyls und den Blättern der Pflanze sowie den Wurzelhaaren exprimiert. Subzellulär ist es in der Membran des Tonoplasten lokalisiert und mobilisiert unter Kupfermangel Cu(I) aus diesem Kompartiment und macht dieses u.a. für die Reproduktionsorgane der Pflanze sowie für den photosynthetischen Elektronentransport verfügbar [54, 55]. Dies konnte durch *copt5* Mutanten gezeigt werden, da diese relativ zum Wildtyp erhöhte Kupferkonzentrationen in den Wurzeln und der Sprossachse sowie eine verringerte Kupferkonzentrationen in den Samen der Pflanzen und eine Beeinträchtigung des Elektronentransfers in der Photosynthese aufweisen [54, 55]. Dies lässt sich auf das Vorkommen von Kupfer in Plastocyanin zurückführen. Plastocyanin stellt das am häufigsten vorkommende Kupferprotein in Pflanzen dar und bindet einen Großteil des in Chloroplasten vorhandenen Kupfers [56]. Dieses Protein übernimmt eine zentrale Funktion in der Elektronentransportkette der Photosynthese, in welcher es Elektronen vom Cytochrom *b₆f*-Komplex auf Photosystem I überträgt und daher essentiell für das Überleben der Pflanze ist [57].

1.3.2 Intrazellulärer Kupfertransport – Kupferchaperone und Peptide

Nach seiner Aufnahme in die Zelle durch die hochaffinen Cu(I)-Transporter der COPT-Proteinfamilie, werden die Cu(I)-Ionen zu ihren Zielkompartimenten und Zielproteinen transportiert. Da freie Kupfer-Ionen jedoch wie bereits in Kapitel 1.3 erwähnt schädlich für die Zelle sind, diffundieren bzw. liegen diese nicht in hydratisierter Form in der Zelle vor, sondern werden durch spezialisierte Transportproteine, sogenannte Kupferchaperone, und kleine, schwefelreiche Peptide komplexiert bzw. stabilisiert und von diesen zu ihren entsprechenden molekularen Zielen transportiert. So wurde z.B. beobachtet, dass vom Kupferchaperon ATX1 gebundenes Cu(I) auch in Gegenwart von Sauerstoff für mindestens 30 Minuten stabil, d.h. in monovalenter Form vorliegen bleibt und nicht oxidiert bzw. disproportioniert [58]. In Bezug auf die Affinität für Cu(I)-Ionen konnten für einige Kupferchaperone femtomolare (10^{-15} M) und höhere Affinitäten für Cu(I)-Ionen ermittelt werden [59]. Abschätzungen der Konzentration freien Kupfers für den Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* (Hefe) ergaben, dass durch diese hohen Affinitäten der Kupferchaperone für Cu(I) erreicht wird, dass keine freien Cu(I)-Ionen in der Zelle vorliegen [60].

In *Arabidopsis* wurden bis heute u.a. die Kupferchaperone ATX1, CCH, CCS, COX11, COX17, PCH1 sowie die SCO1/2-Homologe HCC1/2 identifiziert, von welchen ATX1, CCH sowie CCS und PCH1 zu den ATX1-ähnlichen Kupferchaperonen zählen bzw. im Falle von CCS eine solche Domäne enthalten [27, 61]. ATX1 und CCH besitzen eine hohe Sequenzhomologie, CCH unterscheidet sich strukturell jedoch von ATX1 durch eine zusätzliche, C-terminale Domäne. Diese zusätzliche Domäne mit einer Länge von 44 Aminosäuren existiert nur in höheren Pflanzen [27]. Ihre Funktion konnte trotz intensiver Analysen aber bis heute nicht eindeutig identifiziert werden [62-64]. Jedoch existieren Hinweise darauf, dass CCH für die Mobilisierung von Cu(I) aus absterbenden Organen und somit einen interzellulären Cu(I)-Transport zuständig ist, wohingegen ATX1 für den intrazellulären Transport von Cu(I) verantwortlich ist [65]. Während nur Hinweise für die zelluläre Lokalisation von CCH existieren, konnte hingegen für ATX1 in *Arabidopsis* eine eindeutige Lokalisation im Cytosol gezeigt werden [27]. In Einklang mit dieser Hypothese wurde beobachtet, dass ATX1, CCS und COX17 in Gegenwart erhöhter Kupferkonzentrationen verstärkt exprimiert werden, wohingegen die Expression von CCH herabreguliert wird [23]. ATX1 interagiert zudem mit mehreren Proteinen der P_{1B}-Typ ATPasen. Für ATX1 aus *Arabidopsis* konnte beispielsweise eine direkte Interaktion mit HMA5 und HMA7 (RAN1) mittels des *yeast two-hybrid* Assays gezeigt werden, wohingegen nur eine verkürzte Variante von CCH (CCH Δ), welcher die zusätzliche C-terminale Domäne fehlt, nicht aber das Volllängenprotein CCH mit diesen HMAs interagiert [27, 44]. Die Interaktion von ATX1-ähnlichen Chaperonen mit P_{1B}-Typ ATPasen konnte generell für eine Vielzahl von Spezies demonstriert werden, u.a. auch für die entsprechende Homologe aus Hefe und Mensch aber auch Bakterien [66-68]. Darüber hinaus

existiert eine direkte Verbindung der pflanzlichen Kupferhomöostase mit dem Ethylensignalweg, diese wird in den Kapiteln 1.4.2 und 1.4.3 genauer ausgeführt. Erst kürzlich konnte eine direkte Protein-Protein Interaktion der Kupferchaperone ATX1 und CCH mit der Transmembrandomäne des Ethylenrezeptors ETR1 aus *Arabidopsis* sowie eine Übertragung von Cu(I)-Ionen von diesen Kupferchaperonen auf die Transmembrandomäne des Rezeptors nachgewiesen werden [69].

ATX1-ähnliche Kupferchaperone weisen ein Ferredoxin-ähnliches $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ -Faltungsmotiv auf, in welches ein exponiertes *MxCxC*-Aminosäuresequenzmotiv eingebettet ist. Die in dieser Aminosäuresequenz enthaltenen Cysteine sind linear angeordnet und für die Bindung bzw. Koordination von Cu(I) zuständig [70]. Dieses Faltungs- und Aminosäuresequenzmotiv ist in vielen Cu(I)-transportierenden bzw. -bindenden Proteinen konserviert und findet sich somit auch in den regulatorischen metallbindenden Domänen (MBDs) von Cu(I)-transportierenden P_{1B} -Typ ATPasen wieder [71, 72]. Eine Sequenzanalyse von Kupferchaperonen und MBDs von Cu(I)-transportierenden P_{1B} -Typ ATPasen aus verschiedenen pro- und eukaryotischen Organismen ergab, dass Kupferchaperone P_{1B} -Typ ATPasen durch elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen erkennen bzw. an diese binden, welche beide Proteine so orientieren, dass ein Austausch des Cu(I)-Ions trotz der hohen Cu(I)-Affinitäten beider Proteine ermöglicht wird. Die Oberflächen des jeweiligen Chaperon-MBD Paares weisen daher eine gegensätzliche Ladungsverteilung auf, welche zwischen den Interaktionspartnern konserviert ist [72]. Bei der Übertragung von Cu(I) vom Kupferchaperon auf die MBD der P-Typ ATPase kommt es zur Ausbildung eines heterodimeren Proteinkomplexes, in welchem das Cu(I)-Ion von beiden *CxC*-Motiven gebunden vorliegt und die beiden Monomere miteinander verbindet. Ebenso wie in diesem heterodimeren Komplex konnten auch homodimere Proteinkomplexe des humanen- ATX1 (HAH1) und des Hefe-Kupferchaperons ATX1 kristallisiert werden. In diesen Komplexen liegen, analog zum heterodimeren Komplex, beide Chaperon-Monomere über ein Cu(I)-Ion verbunden vor [73, 74]. Ferner kommt es bei der Übertragung des zweifach koordinierten Cu(I)-Ions vom Kupferchaperon auf die MBD der P_{1B} -Typ ATPase zur Bildung eines intermediären Zustandes, in welchem das Cu(I)-Ion dreifach koordiniert vorliegt. Bei dem dritten Koordinationsliganden handelt es sich um ein Cystein des *CxC*-Motivs der MBD. Der Transfer des Cu(I)-Ions von einem Kupferchaperons auf eine MBD ist schematisch in Abbildung 1.2 dargestellt. Wenn beide Interaktionspartner derart orientiert sind, dass alle drei Liganden die gleiche Bindungsenergie aufweisen, kommt es zu einer schnellen Übertragung des Cu(I)-Ions vom Chaperon auf die MBD und das Cu(I)-Ion liegt anschließend an die MBD gebunden vor. In dieser liegt es dann durch das *CxC*-Motiv der MBD linear koordiniert vor [58]. Der Kupfertransfer ist jedoch reversibel, d.h. Cu(I) kann vom entsprechenden Chaperon auf eine MBD und umgekehrt übertragen werden [75]. Somit ist trotz der hohen Cu(I)-Affinitäten der Kupferchaperone und MBDs, welche sich wie eingangs erwähnt, im femto- bis

atto-molaren (10^{-15} - 10^{-18} M) Konzentrationsbereich befinden, ein schneller Ligandenaustausch des Cu(I)-Ions möglich [59, 75]. Ebenso zeigt eine Studie, dass die Übertragung des Cu(I)-Ions nicht aus thermodynamischen Gründen erfolgt und dementsprechend nicht auf eine (deutlich) höhere Affinität der Zielstruktur für Cu(I) zurückzuführen ist, sondern dass durch die Interaktion des Kupferchaperons mit der MBD/Zielstruktur die Transferrate für den Austausch des Cu(I)-Ions erhöht wird und somit einer kinetischer Kontrolle unterliegt [76].

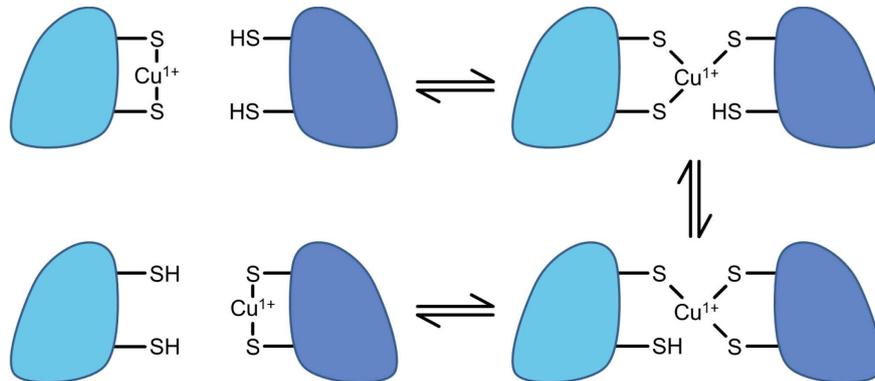


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Austauschs von Cu(I)-Ionen zwischen einem Kupferchaperon und einer regulatorischen Metallbindedomäne einer kupfertransportierenden P-Typ ATPase. Ein monovalentes Kupfer-Ion liegt an einem Kupferchaperon gebunden vor, dabei wird es von zwei Cysteinen linear koordiniert. Durch Protein-Protein-Interaktion bindet das Kupferchaperon an eine Metallbindedomäne (MBD) einer P1B-Typ ATPase wobei beide Kupferbinde-Motive zueinander ausgerichtet sind. Das Kupfer-Ion wird dann durch entsprechende Konformationsänderungen vom Kupferchaperon unter Ausbildung von Zwischenzuständen, in welchen das Cu(I)-Ion dreifach koordiniert vorliegt, auf die MBD übertragen. Der Transfer ist reversibel. Abbildung erstellt mit MS PowerPoint.

Eine Besonderheit stellt das ATX1-ähnliche Kupferchaperon PCH1 dar. Für dieses kodiert kein eigenständiges Gen wie z.B. für ATX1 oder CCH, stattdessen geht dieses aus einem alternativen Spleißvorgang der PAA1/HMA6 prä-mRNA hervor und besteht somit aus der MBD von HMA6 [77]. PCH1 ist im Intermembranraum der Chloroplasten lokalisiert, wo es die in der inneren Chloroplastenmembran lokalisierte HMA6 mit Cu(I)-Ionen beliefert. Diese transportiert Cu(I) anschließend in das Stroma der Chloroplasten, wo dieses von CCS aufgenommen und schließlich auf die plastidäre Cu/Zn-Superoxid Dismutase (SOD) übertragen wird [77-79]. Im Gegensatz zu ATX1 besitzen die Kupferchaperone CCS, COX11, COX17 und HCC1/2 Spezifität für bestimmte Zielproteine.

Das Kupferchaperon CCS weist Spezifität für die Cu/Zn-SOD und beliefert diese mit Cu(I). Dabei stellt CSS den Cu(I)-Kofaktor sowohl für die cytosolische, als auch die plastidäre und mitochondriale SOD bereit. In den Chloroplasten existieren zwei Isoformen der SOD, die sich durch die Art ihres Kofaktors unterscheiden. Dabei handelt es sich in *Arabidopsis* um eine Cu/Zn-SOD und eine eisenabhängige Fe-SOD, aber es existiert in der Matrix der

Mitochondrien auch eine Mn-SOD, welche Mangan als Kofaktor verwendet [80-82]. Die Funktion dieser Enzyme besteht in der Desaktivierung bzw. Entgiftung von ROS, indem sie Superoxidanion ($O_2^{\bullet-}$) zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid umsetzen, welches wiederum von Katalasen weiter zu Wasser und Sauerstoff zersetzt wird (Abbildung 1.3) [83]. Die vollständige Dismutation von Superoxid erfolgt in zwei Reaktionsschritten. Im ersten Reaktionsschritt wird ein Superoxidanion zu Sauerstoff oxidiert und der Kofaktor der SOD reduziert. Anschließend wird ein weiteres Superoxidanion zu Wasserstoffperoxid reduziert, wobei der Kofaktor reoxidiert wird und ein weiterer Katalysezyklus beginnen kann. Somit ist für die Disproportionierung von Superoxid die sequentielle Bindung von zwei Superoxidanionen sowie der zyklische Wechsel des Cu-Kofaktors zwischen zwei Redox-Zuständen nötig [84]. Diesen erhält die Cu/Zn-SOD durch das für sie spezifische Kupferchaperon CCS. Dieses besteht aus drei Domänen, Domäne I weist ein ATX1-ähnliches Faltungsmotiv auf, welche das konservierte, Cu(I)-bindende *MxCxxC*-Motiv enthält. Auf diese folgt eine Cu/Zn-SOD-ähnliche Zentraldomäne (Domäne II), welcher jedoch die für die SOD katalytisch relevanten, strukturellen Elemente fehlen sowie eine C-terminalen Domäne (Domäne III) in welcher zwei konservierte Cysteine lokalisiert sind [61, 85].

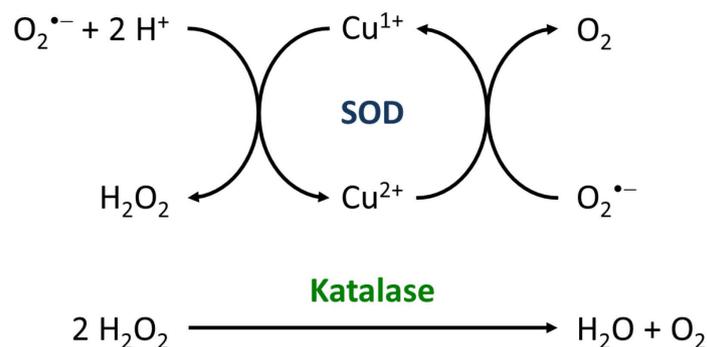


Abbildung 1.3: Enzymkatalysierte Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies. Um Zellschäden und oxidativen Stress zu verhindern, werden reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in der Zelle enzymatisch unschädlich gemacht. Das Enzym Cu/Zn-Superoxid Dismutase (SOD) nutzt einen Cu(I)-Kofaktor um Superoxid, welches u.a. als Nebenprodukt der oxidativen Phosphorylierung entsteht, in ungefährlichen Sauerstoff und Wasserstoffperoxid zu überführen. Letzteres wird anschließend weiter durch das Enzym Katalase zu Sauerstoff und Wasser abgebaut. Neben Kupfer nutzen einige SODs auch Eisen oder Mangan als Kofaktor. Der Metall-Kofaktor dient dabei der vorübergehenden Speicherung eines Elektrons, bevor dieses auf ein weiteres Superoxid-Anion übertragen und dieses in Wasserstoffperoxid überführt wird. Abbildung erstellt mit MS PowerPoint.

Da die Zentraldomäne eine hohe Sequenzhomologie zur SOD aufweist, beinhaltet diese ebenso alle notwendigen Aminosäuren, die auch für die Homodimerisierung der SOD und damit auch für die Spezifität von CCS für die Cu/Zn-SOD notwendig sind. Dies ermöglicht eine direkte Interaktion von CCS mit der SOD in deren Verlauf es zu einer Übertragung des Kupfers von CCS auf die SOD kommt [86, 87]. In Einklang damit, konnte ein entsprechender Heterodimerkomplex für die entsprechenden Hefe-Proteine kristallisiert und seine Struktur aufgeklärt werden [88].

Das Kupferchaperon COX17 ist sowohl im Cytosol, als auch im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert und an der Bereitstellung von Kupfer für die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierte Cytochrom-c-Oxidase (COX), dem Atmungskettenkomplex IV, beteiligt [89]. COX17 überträgt Cu(I) auf SCO1/2 sowie auf COX11, welche dieses wiederum auf die verschiedenen COX-Untereinheiten übertragen. Indirekt übergeben SCO1/2 Kupfer hierbei an die COX2-Untereinheit, wohingegen COX11 Kupfer auf das Reaktionszenter der COX-Untereinheit COX1 überträgt [90, 91]. COX17 weist jedoch nicht das Ferredoxin-ähnliche Faltungsmotiv auf, sondern liegt zu einem großen Teil ungefalten im Cytosol vor und nimmt erst eine helikale-Haarnadel-Faltung im Intermembranraum der Mitochondrien unter Ausbildung von zwei intramolekularen Disulfidbrücken ein, welche von zwei CX₍₉₎C Aminosäuresequenzmotiven in parallelen Helices ausgebildet werden [92]. Verantwortlich für die Bindung von Cu(I) sind hier zwei aufeinanderfolgende Cysteine [92, 93].

Neben den Kupfer- bzw. Metallochaperonen im Allgemeinen bilden Pflanzen zudem weitere Proteine, Peptide und kleine Moleküle, welche ebenso am Transport, der Speicherung und Entgiftung von Schwermetallionen beteiligt sind. Diese sind jedoch im Vergleich zu den Kupferchaperonen weniger spezifisch für ein bestimmtes Metallion und besitzen ein breites Substratspektrum. Die prominentesten Vertreter dieser Proteine und Peptide stellen die Metallothioneine und Phytochelatine dar, welche von der Pflanze speziell als Antwort auf Schwermetallstress gebildet werden, jedoch ist auch das redoxaktive Tripeptid Glutathion (GSH) aufgrund seiner von einem Cystein stammenden Thiolgruppe in der Lage, Komplexe mit Metallionen zu bilden [94]. Bei Glutathion handelt es sich um ein Tripeptid mit der Aminosäuresequenz γ -Glu-Cys-Gly, welches in zellulären Konzentrationen von bis zu 10 mM vorkommt und sowohl in Eukaryoten, als auch einigen Prokaryoten zu finden ist [95, 96]. Experimente, in welchen die Verteilung und Bindung von radioaktivem ⁶⁷Cu an zelluläre Liganden untersucht wurde legen nahe, dass es sich bei Glutathion um den ersten Akzeptor für Kupfer nach dessen Aufnahme in die Zelle handelt [97]. Dieser Cu(I)-GSH-Komplex kann dann Cu(I) auf Metallothioneine oder Kupferchaperone übertragen, was im Falle des Kupferchaperons eine Dimerisierung auslöst wobei das Dimer in Gegenwart von Glutathion

auch eine veränderte Stöchiometrie aufweisen kann. Es konnte gezeigt werden, dass ATX1 aus Hefe in Gegenwart von Glutathion ein binukleäres, kupferverbundenes Homodimer ausbildet, welches zudem zwei Glutathionmoleküle enthält [98].

Bei Metallothioneinen und Phytochelatinen handelt es sich in beiden Fällen um kleine, cysteinreiche Proteine bzw. Peptide. Metallothioneine unterscheiden sich aber von Phytochelatinen u.a. dadurch, dass für diese kodierende Gene im pflanzlichen Genom vorliegen, wohingegen Phytochelatine enzymatisch aus dem Vorläufermolekül Glutathion von einer Phytochelatin-Synthase gebildet werden [99]. Phytochelatine weisen zudem eine variable Größe bzw. Länge mit der Aminosäuresequenz $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ auf, wobei n typischerweise von 2 bis 11 reichen kann [100]. Phytochelatine sind u.a. in der Lage Komplexe mit Cu, Cd und Pb zu bilden, wodurch die toxischen Eigenschaften dieser Metalle minimiert werden [101-103]. Es konnte zumindest für Cd gezeigt werden, dass die Affinität von Phytochelatinen zu diesem Metall abhängig von der Länge des Phytochelatins und damit von der Anzahl der Cysteinliganden abhängt, wodurch die zelluläre Konzentration freien Cadmiums effizient im pico- bis femtomolaren Konzentrationsbereich gepuffert werden kann [104]. Ebenso wie Glutathion und teilweise auch Phytochelatine sind Metallothioneine direkt an der Bindung und damit der Entgiftung von überschüssigem Kupfer und weiteren Metallionen mittels Cysteinseitenketten beteiligt. Für ein Metallothionein aus Hefe wurde gezeigt, dass dieses bis zu acht Cu(I)-Ionen durch 12 Cysteine pro Molekül binden kann, wohingegen nur vier Cd(II) oder Zn(II)-Ionen pro Molekül gebunden werden können [105]. Weiterhin konnte mittels T-DNA Insertionsstudien in *Arabidopsis* eine Funktion von Metallothioneinen in der Remobilisierung von Kupfer aus seneszierenden Organen gezeigt werden [106]. Aktuell wird davon ausgegangen, dass Metallothioneine in Pflanzen hauptsächlich an der Kupferhomöostase beteiligt sind, wohingegen Phytochelatine für die Vermittlung der Toleranz gegenüber Cadmium verantwortlich sind [107-109]. Die Vielzahl an kupferbindenden Proteinen, Peptiden und kleineren Moleküle sowie ihr Zusammenspiel und ihre Regulation verdeutlichen die Komplexität der Aufrechterhaltung der Kupferhomöostase und generell der Distribution von Kupfer in Pflanzen.

1.3.3 Funktion von P-Typ ATPasen als Kupfertransporter

Neben den passiven Kupfertransportern der COPT-Familie existieren ebenfalls aktive Kupfertransporter, die den Transport von Kupfer entgegen eines Konzentrationsgefälles bewerkstelligen. Die entsprechenden Proteine bzw. Transporter zählen zu den P_{1B}-Typ ATPasen, einer Untergruppe der P-Typ ATPasen. Wie aus dem Namen bereits hervorgeht, handelt es sich um primär aktive Transporter, da der Transport des entsprechenden Substrats gegen einen Konzentrationsgradienten unter Verbrauch von ATP erfolgt [110]. Den P-Typ ATPasen ist ein ähnlicher Aufbau gemeinsam, jedoch werden sie aufgrund von Substratspezifität, ihrer Architektur, Sequenzähnlichkeiten und spezieller Sequenzmotive in ihrem Transmembranbereich in verschiedene Klassen, P1 bis P5, und innerhalb dieser in weitere Unterklassen eingeteilt [111]. Die P_{1B}-Typ ATPasen weisen eine hohe Affinität für Übergangs- bzw. Schwermetalle wie z.B. Kupfer auf, weshalb diese wie bereits zuvor erwähnt auch als Heavy Metal ATPases (HMAs) bezeichnet werden. Im Genom von *Arabidopsis* wurden insgesamt über 40 Gene identifiziert, welche für eine P-Typ ATPase kodieren [112]. Acht dieser Gene kodieren dabei für eine HMA, die sich ebenso wie die verschiedenen COPTs in ihrer subzellulären Lokalisation unterscheiden. Von diesen acht HMAs handelt es sich bei HMA5-8 um Kupfertransporter, welche spezifisch für Kupfer in der Oxidationsstufe +1 sind. Von HMA1 wird vermutet, dass es sich um einen Transporter für Kupfer in der Oxidationsstufe +2 handelt und am Import von Kupfer in die Chloroplasten beteiligt ist [22, 45]. Daher wird HMA1 in allen grünen Geweben der Pflanze exprimiert [45]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass HMA1 ein breites Substratspektrum besitzt und neben Cu(II) ebenfalls Ca(II), Cd(II), Co(II) und Zn(II) transportieren kann, weshalb sich HMA1 nicht als spezifischer Kupfertransporter bezeichnen lässt [22, 113, 114]. Ebenso wie HMA1 sind auch HMA6 (PAA1) und HMA8 (PAA2) in den Membranen der Chloroplasten lokalisiert. Mittels verschiedener GFP-Fusionskonstrukte konnte gezeigt werden, dass HMA6 wahrscheinlich in der inneren Chloroplastenmembran lokalisiert ist und aus dem Cytosol stammendes Cu(I) in das Stroma des Chloroplasten importiert [115]. Dort wird es z.B. von CSS aufgenommen und auf die plastidäre Cu/Zn-SOD (CSD2) übertragen, in welchem es als Kofaktor fungiert [79]. Für HMA8 wurde mit derselben Methode eine Lokalisation in den Thylakoidmembranen der Chloroplasten beobachtet [115]. Dort importiert HMA8 Cu(I) in das Lumen der Thylakoide und stellt es somit dem Plastocyanin bereit [115]. Weiterhin wurde festgestellt, dass der plastidäre Kupfergehalt Plastocyanin-abhängig die Stabilität von HMA8 beeinflusst [116]. Dies wurde aus Experimenten gefolgert, welche den Einfluss von Kupfer im Anzuchtmedium von *Arabidopsis* auf die Expression von HMA6 und HMA8 untersuchten. Eine erhöhte Kupferkonzentration im Anzuchtmedium reduzierte die Expressionslevel von HMA8, wohingegen kein Einfluss auf HMA6 festgestellt werden konnte [116]. Im Gegensatz zu den vorher genannten HMAs ist HMA5 wahrscheinlich in der Plasmamembran lokalisiert und wird vermehrt in Zellen der

Wurzel exprimiert [44]. Da die Expression dieser HMA durch erhöhte Kupferkonzentrationen verstärkt wird, wird vermutet, dass HMA5 an der Entgiftung, d.h. dem Export von Kupfer aus dem Cytosol beteiligt ist [23]. Dies wird auch daran deutlich, dass die *Arabidopsis*-Mutante *hma5* deutlich mehr Kupfer als der Wildtyp unter Kupferüberschussbedingungen in der Wurzel akkumuliert [44]. Ebenso wird davon ausgegangen, dass HMA5 für den Transport von Kupfer in das Xylem und somit der Distribution von Kupfer in der gesamten Pflanze verantwortlich ist, da eine entsprechende Funktion für HMA5 aus Reis gezeigt werden konnte [117]. Wie Kupfer dann aus dem Xylem entnommen wird, ist nicht vollständig geklärt. Wahrscheinlich erfolgt dies in den entsprechenden Geweben durch den Kupfertransporter COPT6, welcher verstärkt in Blättern und dort in der Plasmamembran der mit den Leitbündeln assoziierten Zellen exprimiert wird [46]. Über diese Transportroute kann Kupfer durch die Wurzel aus der Umgebung aufgenommen und z.B. für photosynthetisch relevante Proteine bereitgestellt werden. HMA7, auch bekannt als *Responsive To Antagonist 1* (RAN1), ist wegen seiner Verbindung mit dem Ethylensignalweg bekannt. Dieses ist in der Membran des ER lokalisiert und katalysiert den Import von Cu(I), welches essentiell für die Biogenese und die Funktion der Ethylenrezeptoren ist [20, 31, 118]. Ebenso wurde von einer direkten Interaktion von HMA7/RAN1 mit Ethylenrezeptoren in der ER-Membran berichtet [69]. Der direkte Zusammenhang von Kupfer und dem Ethylensignalweg wurde erstmals durch genetische *Screening*-Verfahren verdeutlicht, in denen *Arabidopsis*-Mutanten identifiziert wurden, die Resistenzen gegen den Ethylen-Antagonisten *trans*-Cycloocten besitzen. Im Zuge dieses *Screenings* wurde dann auch HMA7/RAN1 entdeckt [20]. Mehrere Mutationen im Gen dieses Proteins führten zu einer konstitutiven Ethylenantwort oder waren letal für die Pflanze [118, 119] wodurch eine direkte Verbindung von RAN1 und somit von Cu(I) mit dem Ethylensignalweg bzw. den zugehörigen Rezeptoren gezeigt wurde. Bei den verbliebenen HMAs 2 und 4 handelt es sich um Zn(II) Transporter, welche für die Verteilung von Zn(II) zwischen der Wurzel und der Sprossachse verantwortlich sind [120-122]. Pflanzen, in denen HMA3 überexprimiert wurde, zeigten eine erhöhte Toleranz gegenüber verschiedenen Schwermetallen wie Cd(II), Co(II) und Pb(II). Da HMA3 in der Membran der Vakuole lokalisiert ist, wird angenommen, dass HMA3 generell an der Entgiftung von Schwermetallen beteiligt ist, indem es diese in die Vakuole einlagert [123].

Das komplexe Zusammenspiel der Kupfertransporter aus den verschiedenen Proteinfamilien ermöglicht somit die Aufnahme von Kupfer aus der Umgebung durch die Wurzel sowie dessen Speicherung und Transport zu den pflanzlichen Organen, Zellorganellen und letztendlich Proteinen, die Kupfer für ihre korrekte Funktion benötigen. Gleichzeitig werden schädliche Effekte durch spezialisierte Transportproteine und entgiftende Enzyme wie z.B. SODs reduziert. Das komplexe Distributionsnetzwerk bestehend aus membranständigen Transportern, löslichen Kupferchaperonen sowie weiteren wichtigen Proteinen und Peptiden ist schematisch in Abbildung 1.4 dargestellt.

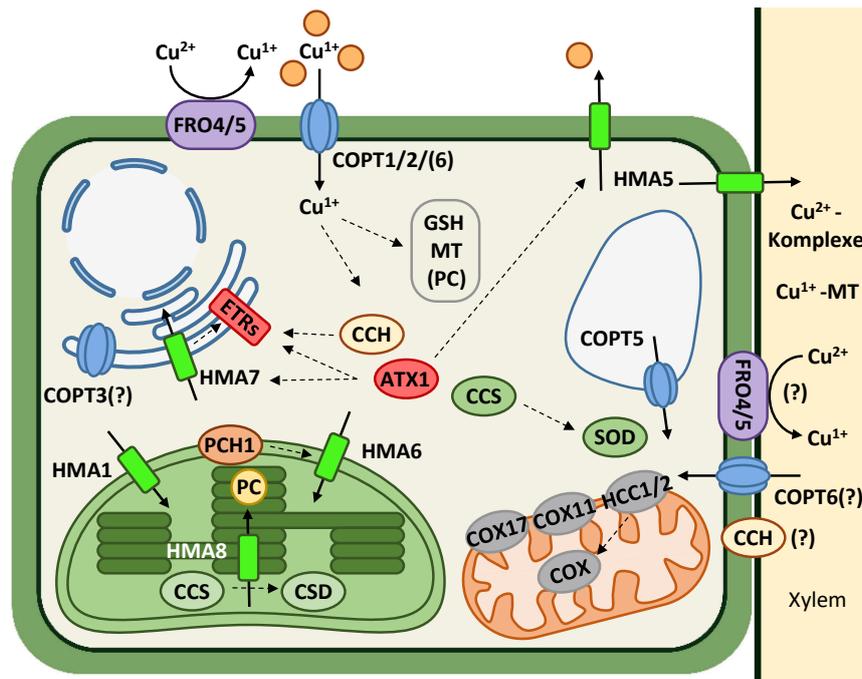


Abbildung 1.4: Aufnahme und Distribution von Kupfer in Pflanzen. Kupfer wird in monovalenter Form aus der Umgebung mittels hochaffiner Transporter der COPT-Familie (blau) aufgenommen. Um die Aufnahme durch diese Transporter zu ermöglichen, werden Cu(II)-Ionen zunächst u.a. an der Wurzeloberfläche durch die Eisen(III)-Chelat-Reduktasen FRO4/5 zu Cu(I)-Ionen reduziert. Nach deren Aufnahme in die Zelle durch die Transporter COPT1/2/6 wird Cu(I) sehr wahrscheinlich zunächst durch Glutathion (GSH) komplexiert und anschließend an cytoplasmatische Kupferchaperone aus der Familie der ATX1-ähnlichen Kupferchaperone übergeben. Kleine, cysteinreiche Peptide wie Metallothioneine (MTs) stellen zudem Speicherproteine für Cu(I)-Ionen dar und puffern die intrazelluläre Konzentration freier Cu(I)-Ionen um die Bildung von ROS zu minimieren. Ebenso können Phytochelatine (PCs) unter Kupferstress dazu beitragen, freies Kupfer zu binden. Diese besitzen ein breites Substratspektrum und sind daher in der Lage, verschiedene Metallionen zu binden. Die Kupferchaperone ATX1, CCH und CCS übergeben Kupfer dann entweder direkt auf ein Zielprotein, wie im Falle von CCS, welches Kupfer für die SOD bereitstellt, oder an eine HMA (grün). Diese transportieren Kupfer ATP-abhängig in diverse Kompartimente. HMA1, HMA6 und HMA8 importieren Kupfer in die Chloroplasten, in deren Stroma sowie in das Thylakoid-Lumen und stellen es dort für die plastidäre SOD (CSD) und Plastocyanin (PC) bereit. HMA5 ist in der Plasmamembran lokalisiert und am Export von Kupfer in das Xylem und damit an der Distribution von Kupfer in der gesamten Pflanze beteiligt. HMA7 importiert Kupfer in das ER, dort wird dieses von den Ethylenrezeptoren (ETRs) benötigt. Wie genau die ETRs ihren Cu(I)-Kofaktor erhalten bzw. aufnehmen, ist noch nicht bekannt, jedoch ist *in vitro* eine direkte Übertragung von Kupfer von ATX1 und CCH auf die Ethylenrezeptoren gezeigt worden [69]. ATX1 interagiert zudem direkt mit HMA5 und HMA7. In den Mitochondrien wird Kupfer für die Cytochrom-c-Oxidase (COX) benötigt und dieses dort durch die Kupferchaperone COX17, COX11 und HCC1/2 bereitgestellt. Für CCH wird auch eine Funktion im interzellulären Kupfertransport angenommen. Abbildung erstellt mit MS PowerPoint.

1.3.4 Aufbau von kupfertransportierenden P_{1B}-Typ ATPasen

P-Typ ATPasen bilden eine Familie von integralen Membranproteinen, die Kationen und Lipide unter ATP-Verbrauch gegen einen Konzentrationsgradienten durch eine Lipid-Doppelmembran transportieren. Wie bereits im Kapitel zuvor erwähnt, werden diese in fünf Klassen (P1-P5) eingeteilt, welche wiederum in weitere Unterklassen aufgeteilt werden und sich u.a. in der Substratspezifität unterscheiden [111, 124, 125]. P-Typ ATPasen besitzen sowohl eine α -helikale Transmembrandomäne (TMD), als auch ausgedehnte, cytosolische Domänen. Die verschiedenen Klassen unterscheiden sich neben ihrer Substratspezifität auch in ihrem Aufbau durch eine variierende Anzahl von Domänen und Sekundärstrukturelementen in diesen Domänen, wie z.B. in der Anzahl ihrer Transmembranhelices. So besitzen schwer-/übergangsmetallspezifische P_{1B}-Typ ATPasen sechs bis acht Transmembranhelices, wobei die Anzahl der Transmembranhelices für P-Typ ATPasen aber generell zwischen sechs und zehn betragen kann. Die Anzahl der Transmembranhelices ist jedoch immer geradzahlig [126]. Die TMD bildet zudem das Translokation für das Metallion durch die Membran und weist zwei ausgedehnte, cytoplasmatische Schleifen auf. Diese enthalten drei konservierte Domänen, die Aktuator- (A), die Nukleotidbindungs- (N) und die Phosphorylierungsdomäne (P) von welchen die N- und P-Domäne auch als ATP-bindende Domäne (ATPBD) zusammengefasst werden [124, 127]. Die N-Domäne bindet ATP und fungiert als Kinase, welche ein Aspartat in einem konservierten DKTGT-Sequenzmotiv innerhalb der P-Domäne phosphoryliert. Anschließend dissoziieren die N- und P-Domäne wodurch die P-Domäne für die A-Domäne zugänglich wird. Diese besitzt eine Phosphataseaktivität und dephosphoryliert die P-Domäne wodurch der Katalysezyklus erneut erfolgen kann [124]. Die bei den verschiedenen Teilschritten auftretenden Konformationsänderungen werden in die TMD übertragen und bewirken den Transport des Metallions durch die Membran [127]. Der Transport erfolgt dabei nach dem Post-Albers-Zyklus, d.h. dass die TMD zwischen einer einwärts- und auswärtsgerichteten Konformation wechselt, wobei diese niemals vollständig für das Substrat passierbar ist [128, 129]. Stattdessen bildet die TMD in beiden Konformationen jeweils einen Halbkanal, welcher entweder zur cytoplasmatischen Seite (einwärts) oder, wie im Fall von RAN1/HMA7, zum Lumen des ER hin geöffnet ist (auswärts). Zusätzlich zu den bereits genannten Domänen können P_{1B}-Typ ATPasen sowohl N-, als auch C-terminal mehrere Metallbindedomänen (MBDs) aufweisen. Im Folgenden wird nun der Aufbau von P_{1B-1}-Typ ATPasen, einer Unterklasse der P_{1B}-Typ ATPasen, welche spezifisch für Cu(I)-Ionen ist, erläutert [125]. Diese besitzen acht Transmembranhelices, von denen die ersten beiden Helices auch als Helix A und B bezeichnet werden, da diese nicht in allen Subfamilien innerhalb der P_{1B}-Typ ATPasen konserviert sind [125]. Auf diese folgen dann die Transmembranhelices (TM) TM1-TM6 von welchen TM2 und TM3 durch eine cytosolische Schleife verbunden sind, welche die A-Domäne beinhaltet. Eine weitere, ausgedehnte

cytosolische Schleife verbindet TM4 und TM5 und enthält die N- und P-Domänen. In TM4 befindet sich zudem ein für den Transport von Cu(I) essentielles CPC-Sequenzmotiv. Die Cu(I)-bindenden MBDs enthalten ein konserviertes CxxC-Motiv und weisen eine Ferredoxin-ähnliche bzw. ATX1-ähnliche Faltung auf, die Anzahl dieser MBDs ist jedoch variabel. So besitzt z.B. RAN1/HMA7 zwei N-terminal gelegene MBDs mit dem konservierten CxxC-Motiv wohingegen z.B. das humane Menkes Proteine ATP7A sechs dieser MBDs besitzt [130, 131]. Der Aufbau von RAN1 sowie der Transportmechanismus (Post-Albers-Zyklus) sind in Abbildung 1.5 verdeutlicht. Die MBDs scheinen für den Transport des Metallions nicht essentiell zu sein, jedoch wurde ein Einfluss der MBDs auf die ATPase Aktivität beobachtet, weshalb eine regulatorische Funktion für die MBDs angenommen wird [132, 133]. Experimentell konnte eine Interaktion der MBDs mit ATX1-ähnlichen Kupferchaperonen gezeigt werden, in deren Zuge Cu(I) vom Kupferchaperon auf die MBDs übertragen wird [134, 135]. Ferner sind die MBDs nicht an der Übertragung von Cu(I) auf das Translokon der ATPase beteiligt. Vielmehr wurde eine direkte Interaktion des löslichen Kupferchaperons mit der Metallbindestelle im Transmembranbereich (TM-MBS) für die Proteine CopZ und CopA des Archaeobakteriums *Archaeoglobus fulgidus* beschrieben [25]. Wie die Regulation der Aktivität durch die MBDs erfolgt, ist nicht vollständig geklärt und Gegenstand aktueller Forschung. Neben den MBDs selbst scheinen aber auch die Linkersequenzen, welche die MBDs miteinander verbinden, bzw. deren Länge wichtig für die regulatorische Funktion der MBDs zu sein [136].

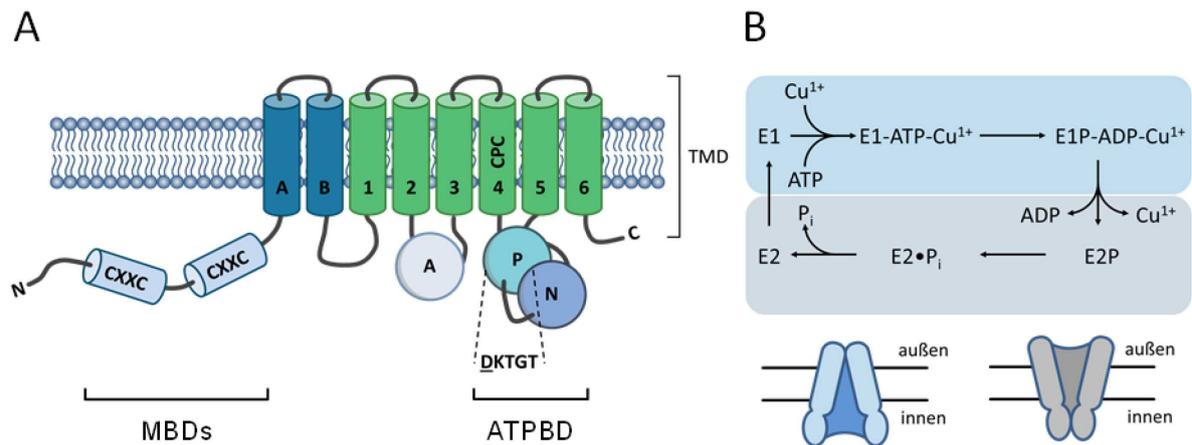


Abbildung 1.5: Schematischer Aufbau der kupfertransportierenden P_{1B}-Typ ATPase HMA7/RAN1 und Darstellung des Transportmechanismus. A) Alle P_{1B}-Typ ATPasen ist ein ähnlicher Aufbau gemeinsam, jedoch existieren innerhalb der P_{1B}-Unterfamilie einige Unterschiede wie z.B. die Anzahl der Transmembranhelices. RAN1/HMA7 zählt zu der Unterfamilie P_{1B-1} und ist somit spezifisch für Cu(I)-Ionen. Diese HMA besitzt insgesamt acht Transmembranhelices, von welchen die ersten beiden Helices als Helix A und B bezeichnet werden, da diese nicht in allen Unterfamilien der P_{1B}-Typ ATPasen konserviert sind. Helix vier enthält ein für den Transport von Cu(I)-Ionen essentielles CPC-Sequenzmotiv, welches direkt mit löslichen Kupferchaperonen interagieren und Cu(I)-Ionen von diesen aufnehmen kann. Helices zwei und drei werden durch die Aktuator-Domäne (A-Domäne), Helices vier und fünf werden durch die ATP-bindende Domäne (ATPBD) bestehend aus der Phosphorylierungs- (P) und Nukleotid-bindenden- (N) Domäne verbunden. Diese drei Domänen sind in allen P-Typ ATPasen konserviert und koppeln ATP-Hydrolyse mit Konformationsänderungen im gesamten Protein und einem damit verbundenen Substrattransport. Ein konserviertes Aspartat (unterstrichen) in der P-Domäne wird während des Reaktionszyklus transient phosphoryliert und ist essentiell für die Funktion. N-terminal befinden sich zwei regulatorische, metallbindende-Domänen (MBDs) mit einem konservierten CxxC-Sequenzmotiv. B) Der Substrattransport erfolgt nach dem Post-Albers-Zyklus. Die ATPase wechselt dabei abhängig vom Phosphorylierungszustand zwischen zwei Konformationen (E1&E2). Diese weisen unterschiedliche Affinitäten für das Substrat auf und bilden Halbkanäle innerhalb der Transmembrandomäne, welche nach innen (E1) oder nach außen (E2) gerichtet sind. Die Anzahl der transportierten Cu(I)-Ionen pro hydrolysiertem ATP ist für RAN1 nicht bekannt. Abbildung B basierend auf [137] und enthält keine Angaben zur Stöchiometrie. Abbildung erstellt mit MS PowerPoint.

1.4 Ethylen als Phytohormon

1.4.1 Funktion von Ethylen als Phytohormon

Bei Ethylen handelt es sich um ein kleines, gasförmiges und hydrophobes Molekül, welches zugleich das einfachste Alken darstellt. Trotz seines hydrophoben Charakters ist Ethylen aber nicht nur in organischen Lösungsmitteln, sondern auch geringfügig in wässrigen Lösungen löslich (ca. 131 mg/L bei Raumtemperatur [138]). Diese Eigenschaften ermöglichen es, dass Ethylen sich so durch das Cytosol von Zellen, sich innerhalb und durch Lipiddoppelschichten sowie über die Luft durch Diffusion ausbreiten kann. Von der Eigenschaft eines Stoffes im Leuchtgas von Straßenlaternen das Wachstumsverhalten von Pflanzen bzw. Bäumen zu beeinflussen, wurde bereits im Jahr 1864 berichtet [139]. Zu diesem Zeitpunkt war jedoch noch nicht bekannt, dass es sich bei der biologisch aktiven Komponente um Ethylen handelt. Dieser Nachweis wurde erst 1901 von Dimitry Neljubow erbracht. Er zeigte, dass Keimlinge der Erbse (*Pisum sativum*), die in Dunkelheit und Gegenwart von Ethylen angezogen wurden, horizontales Wachstum, eine Verdickung des Hypokotyls und eine Inhibierung bzw. Verkürzung des Längenwachstums aufweisen [140]. Diese Beobachtung wurde später als Dreifachantwort (*triple-response*) bekannt, und wird auch heute noch dazu verwendet, Komponenten des Ethylensignalwegs zu identifizieren [141]. Im Jahr 1934 berichtete Richard Gane dann am Beispiel des Apfels, dass Pflanzen selbst dazu in der Lage sind, Ethylen zu synthetisieren [142]. Die Wirkung von Ethylen kann also sowohl durch endogene Bildung, als auch durch exogene Applikation erreicht werden [143]. Es ist u.a. an der Regulation von pflanzlichen Entwicklungsprozessen wie z.B. der Keimung, Seneszenz, Wurzelbildung und Nodulation beteiligt [144]. Zudem vermittelt es Reaktionen der Pflanze auf biotischen und abiotischen Stress wie z.B. bei Pathogenbefall, Verwundung oder Trockenheit [145, 146]. Am bekanntesten ist aber die Wirkung von Ethylen, die Reifung von Früchten auszulösen [144, 147]. Aufgrund dieser Eigenschaften ist Ethylen und die Entwicklung von Ethylen-Antagonisten von besonderem agronomischen und ökonomischen Interesse. So kann z.B. dem Verlust von klimakterische Früchten durch Nachreifung und dem damit verbundenen Verlust während des Transports und der Lagerung mit 1-Methylcyclopropan (1-MCP) entgegengewirkt werden [148].

1.4.2 Der Ethylensignalweg – Signaltransduktion und Komponenten

Die Wahrnehmung von Ethylen und die damit verbundene Signaltransduktion erfolgt mittels spezialisierter Rezeptoren in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) und umfasst ein komplexes Netzwerk von cytoplasmatischen und membrangebundenen Proteinen sowie membranlosen Organellen und Kondensaten, die aus löslichen Proteinen und RNA bestehen [149, 150]. Zudem ist der Ethylensignalweg eng mit der Kupferhomöostase verbunden und wird durch diese ebenfalls in der Stärke der Ethylenantwort reguliert, da die Ethylenrezeptoren einen Cu(I)-Kofaktor für ihre Funktion benötigen [31, 151]. Obwohl die entsprechenden Rezeptoren in der Membran des ER und nicht in der Zellmembran lokalisiert sind, können die Rezeptoren dennoch Ethylen wahrnehmen, was auf die hohe Löslichkeit von Ethylen in der Lipiddoppelschicht und der ebenfalls, wenn auch geringeren, vorhandenen Löslichkeit in wässrigen Lösungen zurückgeht.

Ethylenrezeptoren stellen Negativregulatoren des Ethylensignalwegs dar, d.h. dass eine Ethylenantwort in Abwesenheit des Phytohormons aktiv unterdrückt wird [152]. Die Signaltransduktion wird hierbei hauptsächlich durch das Zusammenspiel von drei Proteinen gesteuert, den Ethylenrezeptoren (ETRs), der Kinase *Constitutive Triple Response 1* (CTR1), die zur Familie der *rapidly accelerated fibrosarcoma* (Raf)-ähnlichen Kinasen gezählt wird sowie das der *natural resistance-associated macrophage protein* (NRAMP) Metallionentransporter-Familie zugehörige Protein *Ethylene Insensitive 2* (EIN2) [153-155]. In Abwesenheit von Ethylen besitzen die Rezeptoren Autokinaseaktivität, welche wiederum zu einer Aktivierung von CTR1 führt [156]. CTR1 phosphoryliert anschließend EIN2, welches ebenfalls in der Membran des ER lokalisiert ist und einen Positivregulator des Ethylensignalwegs darstellt [157, 158]. Als Konsequenz der Phosphorylierung wird EIN2 proteasomal degradiert, was durch die F-Box Proteine *Ein2 Targeting Protein 1/2* (ETP1/2) vermittelt wird [159]. Dies hat weiterhin zur Folge, dass auch die Transkriptionsfaktoren EIN3 und EIN3/*EIN3-Like 1* (EIL1) proteasomalem Abbau unterliegen, was durch die F-Box Proteine *EIN3-Binding F-Box Protein 1/2* (EBF1/2) vermittelt wird und letztendlich zu einem Ausbleiben der Ethylenantwort führt [160, 161].

EIN2 stellt daher einen zentralen Regulator des Ethylensignalwegs dar. Es ist durch einen N-terminalen Bereich, für welchen 12 Transmembranhelices vorhergesagt werden und einem ausgedehnten cytosolischen Bereich gekennzeichnet, welcher neben einer Vielzahl von Phosphorylierungsstellen auch eine *Nuclear Localization Signal* (NLS) Sequenz enthält [153, 162]. Neben dem Ethylensignalweg scheint EIN2 aber ebenso ein zentraler Bestandteil der (nährstoffabhängigen) Steuerung der Zellproliferation zu sein, indem es von der Kinase *Target Of Rapamycin* (TOR) unabhängig vom Ethylensignalweg phosphoryliert werden kann. Dabei

scheint das Phosphorylierungsmuster von EIN2 von den entsprechenden Kinasen abhängig zu sein, sodass EIN2 von verschiedenen Signalwegen verwendet werden kann [163].

In Gegenwart von Ethylen wird die Autokinaseaktivität des Ethylenrezeptors unterdrückt, wodurch die Kinase CTR1 ebenfalls inaktiviert wird. Infolgedessen wird EIN2 nicht degradiert und bindet mittels der NLS-Sequenz an den Rezeptor [162, 164, 165]. Der C-Terminus von EIN2 wird daraufhin durch einen noch unbekanntem Mechanismus von EIN2 abgespalten und erfüllt nun zwei verschiedene Aufgaben. Aufgrund der vorhandenen NLS-Sequenz wird der abgespaltene C-Terminus (EIN2 C-END) zum Einen in den Zellkern transloziert [166]. Dort bindet dieser an das *EIN2 Nuclear Associated Protein 1* (ENAP1) und stabilisiert die Transkriptionsfaktoren EIN3/EIL1, welche schließlich eine Vielzahl von Zielgenen aktivieren [167]. Zum Anderen inhibiert EIN2 C-END die Translation der mRNAs von EBF1/2. Dies erfolgt über die Aufnahme der mRNAs in *processing-bodies* (P-Körper) durch Bindung von EIN2 C-END an den 3'UTR-Bereich der EBF1/2 mRNAs sowie durch weitere Komplexbildung mit Poly-Adenylat- (Poly-A) bindenden Proteinen (PABs) und der Exoribonuklease EIN5 [150, 166, 167]. Es konnte gezeigt werden, dass Poly-Uridylat- (Poly-U) Motive innerhalb der 3'UTR-Region der mRNAs entscheidend für eine EIN2 vermittelte Inhibition der Translation sind [150]. Dies resultiert in der Reduktion der Konzentration von EBF1/2 und trägt somit ebenfalls zu der Akkumulation von EIN3 im Nukleus bei, wodurch die Expression der ethylenspezifischen Zielgene ermöglicht wird [168, 169]. Zudem werden EIN3 und EIL1 dadurch stabilisiert, dass in Anwesenheit von Ethylen vorhandene EBF1/2-Proteine proteasomalem Abbau unterliegen [170]. Der Ethylensignalweg und seine Komponenten sind in Abbildung 1.6 dargestellt.

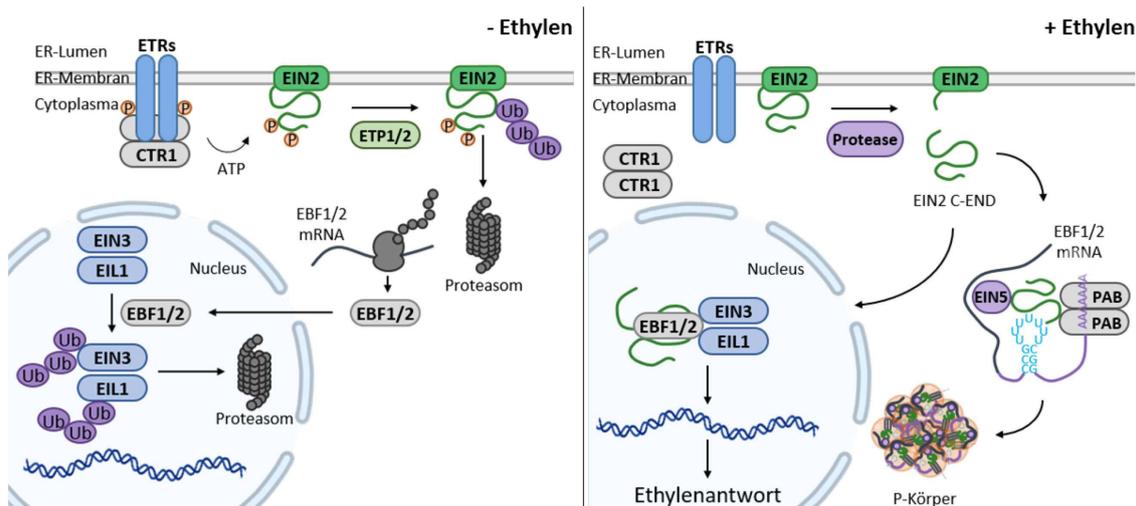


Abbildung 1.6: Der Ethylensignalweg. In Abwesenheit von Ethylen weisen die Ethylenrezeptoren (ETRs) Autokinaseaktivität auf, wodurch diese die Kinase CTR1 aktivieren, welche wiederum den C-Terminus von EIN2 an verschiedenen Positionen phosphoryliert. EIN2 unterliegt dadurch proteasomalem Abbau, ebenso wie die ethylenspezifischen Transkriptionsfaktoren EIN3/EIL1. Deren Abbau wird durch die Proteine EBF1 und EBF2 vermittelt, wodurch letztendlich die Ethylenantwort bzw. die Expression spezifischer Zielgene ausbleibt. In Anwesenheit von Ethylen wird die Autokinaseaktivität der ETRs inhibiert, was zur Folge hat, dass CTR1 ebenfalls inaktiviert wird und EIN2 nicht phosphoryliert wird. Der C-terminus von EIN2 (EIN2 C-END) wird darauf hin durch einen unbekanntem Mechanismus von EIN2 abgespalten und erfüllt nun zwei Aufgaben. Aufgrund einer *Nuclear Localization Signal* (NLS) Sequenz wird EIN2 C-END in den Zellkern transloziert, wo dieses die Transkriptionsfaktoren EIN3/EIL1 stabilisiert und dadurch die Expression spezifischer Zielgene aktiviert. Weiterhin stabilisiert EIN2 C-END diese Transkriptionsfaktoren zusätzlich, indem es im Cytoplasma die Translation der EBF1/2 mRNA durch deren Einlagerung in P-Körper inhibiert. Für die Bildung dieser P-Körper sind weitere Proteine wie Poly-Adenylat-bindende Proteine (PABs) und die Exonuklease EIN5 notwendig. Abbildung erstellt mit MS PowerPoint.

1.4.3 Ethylenrezeptoren – Aufbau und Funktion

Die Anzahl und der Aufbau der verschiedenen Rezeptorisoformen variiert zwischen den Pflanzenspezies, daher wird im Folgenden der Aufbau und die Funktion der Ethylenrezeptoren am Beispiel des Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* erläutert. In *Arabidopsis* wurden bis heute fünf Isoformen des Ethylenrezeptors identifiziert, die aufgrund phylogenetischer Analysen und struktureller Unterschiede in zwei Unterfamilien eingruppiert werden [171-174]. Die Unterfamilie I wird von den Rezeptoren *Ethylene Resistant 1* (ETR1) und *Ethylene Response Sensor 1* (ERS1), die Unterfamilie II von ETR2, ERS2 und *Ethylene Insensitive 4* (EIN4) gebildet [175]. Allen Rezeptoren ist ein modularer Aufbau gemeinsam, welcher durch eine N-terminale Transmembrandomäne gekennzeichnet ist, auf welche eine cytoplasmatische Domäne bestehend aus einer cGMP-spezifischen Phosphodiesterase, Adenyllylzyklase und Fh1a (GAF) und eine Kinasedomäne folgen. Die beiden Unterfamilien

unterscheiden sich im Aufbau des N-Terminus des Rezeptors. Die Rezeptoren der Unterfamilie I weisen drei Transmembranhelices auf, die Rezeptoren der Unterfamilie II hingegen vermutlich vier, da diese N-terminal eine zusätzliche, hydrophobe Domäne besitzen [175]. Die Funktion dieser zusätzlichen hydrophoben Domäne ist aber nicht bekannt, daher wird auch eine Funktion als Signalsequenz diskutiert [176]. Die N-terminale Transmembrandomäne verankert die Rezeptoren in der ER-Membrane und stellt zusätzlich die Sensordomäne für das gasförmige Phytohormon Ethylen dar. Die Bindung von Ethylen an den Rezeptor erfolgt dabei über einen Cu(I)-Kofaktor, welcher in der Transmembrandomäne durch ein Cystein und ein Histidin, bei ETR1 handelt es sich um C65 und H69, koordiniert bzw. gebunden wird [31]. Eine neuere Studie zeigt zudem, dass im Gegensatz zu vorherigen Annahmen dabei ein Cu(I)-Ion pro Monomer gebunden und somit eine 1:1 Protein:Cu(I) Stöchiometrie vorliegt [177].

Die Rezeptoren ETR1, ETR2 und EIN4 besitzen zudem eine C-terminal lokalisierte Empfänger-Domäne, wodurch diese Rezeptoren Charakteristika bakterieller Zwei-Komponenten Systeme aufweisen [178]. Weiterhin zeichnen sich die Rezeptoren der Unterfamilie I durch das Vorliegen einer konservierten Histidinkinasedomäne aus, wohingegen diese in den Rezeptoren der Unterfamilie II nicht vorliegt. Diese Rezeptoren besitzen dennoch Autokinaseaktivität, hierbei werden jedoch Serine und Threonine anstelle von Histidin phosphoryliert. Eine Besonderheit stellt hier ERS1 dar, da dieser Rezeptor sowohl Histidin, als auch Serin/Threonin-Kinase-Aktivität aufweist [179]. Eine Studie zeigte, dass die Kinase-Aktivität der Rezeptoren nicht essentiell für deren Funktion ist, aber einen modulierenden Einfluss auf die Stärke der Ethylenantwort hat. Die Expression einer Kinase-defizienten Mutanten von ETR1 in einem *etr1*, *ers1* Hintergrund (Doppelmutante) zeigte eine reduzierte Ethylensensitivität im Vergleich zu Wildtyp ETR1, exprimiert in derselben Doppelmutante [180]. Ein Vergleich der verschiedenen Ethylenrezeptoren ist in Abbildung 1.7 dargestellt.

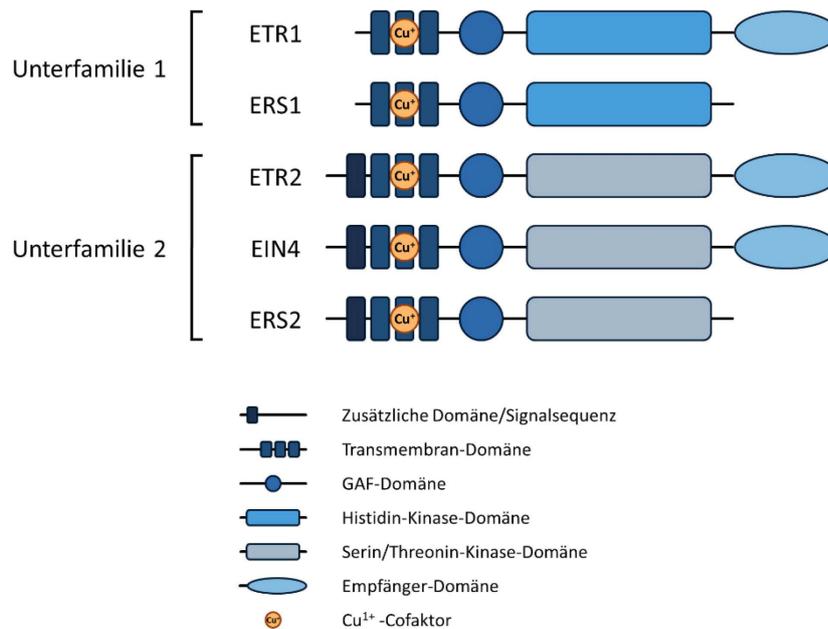


Abbildung 1.7: Schematischer Vergleich der Ethylenrezeptoren aus *Arabidopsis thaliana*. In *Arabidopsis* wurden bis heute fünf Ethylenrezeptoren identifiziert, diese werden aufgrund struktureller Charakteristika in zwei Unterfamilien eingeteilt. Die funktionelle Einheit der Rezeptoren stellt das Dimer dar, der hier dargestellte Aufbau bezieht sich auf die Monomere der verschiedenen Rezeptoren. Alle Rezeptoren benötigen einen Cu(I)-Kofaktor für die Bindung von Ethylen in der Transmembrandomäne. Rezeptoren der Unterfamilie I besitzen drei Transmembranhelices, die Rezeptoren der Unterfamilie II hingegen vier, wobei für die zusätzliche N-terminale Domäne auch eine Funktion als Signalsequenz nicht ausgeschlossen wird. Auf die Transmembrandomäne folgen für alle Rezeptoren eine GAF- und eine Kinase-Domäne. ETR1 besitzt eine Histidin-Kinase, wohingegen die Ethylenrezeptoren der Unterfamilie II Serin/Threonin-Kinaseaktivität aufweisen. ERS1 besitzt als einziger Rezeptor sowohl Histidin-, als auch Serin/Threonin-Kinaseaktivität. Auf die Kinase-Domäne folgt eine Empfänger-Domäne, welche nur in den Rezeptoren ETR1, ETR2 und EIN4 vorliegt und diese Rezeptoren somit Ähnlichkeiten zu bakteriellen Zwei-Komponenten-Systemen aufweisen. Abbildung erstellt mit MS PowerPoint.

Die kleinste funktionelle Einheit der Ethylenrezeptoren stellt das Homodimere dar. In ETR1 werden zwei Monomere kovalent durch Disulfidbindungen der Cysteine an den Aminosäurepositionen vier und sechs miteinander verbunden. Diese Disulfidbindungen existieren in allen Ethylenrezeptoren, jedoch sind die Positionen der verbindenden Cysteine in diesen verschieden [181]. Ferner wurden jedoch auch homo- und heteromere Proteinkomplexe des Rezeptors beobachtet, die nicht kovalent miteinander verbunden sind [182]. Weiterhin wird die Dimerisierung nicht nur durch die Transmembrandomäne, sondern auch durch die GAF-Domäne vermittelt [182]. Diese ist somit an der höhermolekularen Komplexbildung der Rezeptoren und an einer damit verbundenen bzw. vermuteten Regulation der Ethylenantwort beteiligt [183, 184].

2 Zielsetzung

Aufgrund der hormonellen Wirkung von Ethylen auf Pflanzen und seines damit verbundenen Einflusses auf eine Vielzahl verschiedener Prozesse wie z.B. der Stressantwort, Seneszenz oder der Fruchtreifung ist der Ethylensignalweg sowie die zugehörigen Ethylenrezeptoren (ETRs) von großer Bedeutung. Diese Bedeutung wird besonders im Kontext des Klimawandels und der Sicherstellung der Nahrungsmittelversorgung in Zukunft noch weiter zunehmen, weshalb ein detailliertes Verständnis dieses Signalwegs von besonderem wissenschaftlichen Interesse ist. Verantwortlich für die Wahrnehmung dieses Hormons ist eine Gruppe von membranständigen Rezeptoren, welche in der Membran des ER lokalisiert sind und für ihre Funktion einen Cu(I)-Kofaktor benötigen. Trotz intensiver Analysen ist bis heute nicht genau bekannt, wie die Rezeptoren ihren Cu(I)-Kofaktor erhalten, jedoch konnte eine direkte Beteiligung der kupfertransportierenden und ebenfalls in der Membran des ER lokalisierten P_{1B}-Typ ATPase RAN1 nachgewiesen werden [20, 69]. Neuere Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass ETR1 und RAN1 *in vitro* als auch *in vivo* direkt mittels Protein-Protein-Interaktion interagieren, was einen Hinweis darauf liefert, wie die ETRs ihren Cu(I)-Kofaktor erhalten [69].

Höhere Pflanzen besitzen im Gegensatz zu Säugetieren neben ATX1 ein weiteres Kupferchaperon, CCH, welches eine zusätzliche, C-terminale, 40 Aminosäuren lange Domäne mit unbekannter Funktion besitzt. Da dieses Chaperon nur in Pflanzen vorkommt, ist eine direkte oder auch indirekte Verbindung zum Ethylensignalweg bzw. zur Beladung der ETRs denkbar. Untersuchungen der isolierten, C-terminalen Domäne von CCH haben gezeigt, dass diese Domäne intrinsisch ungeordnet ist, sich in dieser jedoch unter bestimmten Bedingungen, verschiedene Sekundärstrukturmerkmale induzieren lassen [64]. Da die Struktur dieser zusätzlichen, pflanzenspezifischen Domäne im Volllängenprotein nicht bekannt ist, bestand ein Ziel dieser Arbeit in der Charakterisierung des CCH-Volllängenproteins.

Für diesen Zweck sollten CCH und eine C-terminale Deletionsmutante, CCH Δ , welche nur die ATX1-ähnliche, N-terminale Domäne aufweist, mittels verschiedener biophysikalischer und biochemischer Methoden charakterisiert und miteinander verglichen werden. Für die Expression und Reinigung dieser Proteine, sind bereits Protokolle etabliert, jedoch mussten diese für bestimmte Charakterisierungen weiter optimiert werden.

In dieser Arbeit sollte zudem anhand des Modell-Ethylenrezeptors ETR1 untersucht werden, wie genau dieser Rezeptor mit RAN1 interagiert und ob bei dieser Interaktion ein direkter Transfer von Cu(I)-Ionen möglich wäre. Weiterhin sollte die Frage beantwortet werden, wie sich diese Interaktion von der Interaktion des Rezeptors mit den löslichen Kupferchaperone ATX1 und CCH unterscheidet. Dafür sollten die Cu(I)-bindenden, N-terminalen Domänen von

RAN1 (MBDs) heterolog in *E. coli* exprimiert und gereinigt werden, um diese Domänen anschließend zu charakterisieren und mit diesen MBDs Interaktionsstudien sowohl mit dem Ethylenrezeptor, als auch mit ATX1 und CCH durchzuführen. Aufbauend darauf sollte dann ein potentieller und detaillierter Mechanismus für den Transfer von Cu(I)-Ionen auf den Ethylenrezeptor vorgeschlagen werden, welcher zur Biogenese des funktionellen Rezeptors führt.

3 Ergebnisse

3.1 Struktur und Dimerisierungseigenschaften des pflanzenspezifischen Kupferchaperons CCH

Titel:	Structure and dimerization properties of the plant-specific copper chaperone CCH
Autoren:	Dominik Dluhosch , Lisa Sophie Kersten, Stephan Schott-Verdugo, Claudia Hoppen, Melanie Schwarten, Dieter Willbold, Holger Gohlke, Georg Groth
Publiziert in:	Scientific Reports, Volume: 14, August 2024, Creative Commons Attribution 4.0 International License
Impact Factor:	3.8 (2023)
DOI:	10.1038/s41598-024-69532-y
Eigener Anteil:	Planung, Design und Durchführung sowie Auswertung von Experimenten, davon: Expression und Reinigung der Kupferchaperone CCH und CCH Δ MST-, Cu(I)-Bindungs- und nDSF-Experimente Statistische Auswertung der nDSF-Daten Erstellen von Abbildungen Verfassen und Strukturieren des Manuskripts



OPEN Structure and dimerization properties of the plant-specific copper chaperone CCH

Dominik Dluhosch¹, Lisa Sophie Kersten², Stephan Schott-Verdugo³, Claudia Hoppen¹, Melanie Schwarten⁴, Dieter Willbold^{4,5}, Holger Gohlke^{2,3} & Georg Groth^{1✉}

Copper chaperones of the ATX1 family are found in a wide range of organisms where these essential soluble carriers strictly control the transport of monovalent copper across the cytoplasm to various targets in diverse cellular compartments thereby preventing detrimental radical formation catalyzed by the free metal ion. Notably, the ATX1 family in plants contains two distinct forms of the cellular copper carrier. In addition to ATX1 having orthologs in other species, they also contain the copper chaperone CCH. The latter features an extra C-terminal extension whose function is still unknown. The secondary structure of this extension was predicted to be disordered in previous studies, although this has not been experimentally confirmed. Solution NMR studies on purified CCH presented in this study disclose that this region is intrinsically disordered regardless of the chaperone's copper loading state. Further biophysical analyses of the purified metallochaperone provide evidence that the C-terminal extension stabilizes chaperone dimerization in the copper-free and copper-bound states. A variant of CCH lacking the C-terminal extension, termed CCHΔ, shows weaker dimerization but similar copper binding. Computational studies further corroborate the stabilizing role of the C-terminal extension in chaperone dimerization and identify key residues that are vital to maintaining dimer stability.

Keywords Metallochaperone, Plant copper chaperone, ATX1 family, Dimerization, Protein–protein interaction

Abbreviations

3D-RISM	3D reference interaction site mode
ANOVA	Analysis of variance
ATOX1 (HAH1)	Antioxidant 1 copper chaperone
ATX1	Antioxidant protein 1
BCA	Bicinchoninic acid
BCS	Bathocuproine disulfonate
BEST-TROSY	Band-selective excitation short-transient-transverse relaxation-optimized spectroscopy
CCH	Copper chaperone
CCP	Copper chaperone induced by pathogens
CD	Circular dichroism
CopZ	Copper chaperone Z from <i>Bacillus subtilis</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EPR	Electron paramagnetic resonance
ER	Endoplasmic reticulum
GPU	Graphics processing unit
HADAMAC	Hadamard-encoded amino acid type editing
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethane-1-sulfonic acid
His-tag	Polyhistidine-tag

¹Institute of Biochemical Plant Physiology, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany. ²Institute for Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany. ³Institute of Bio- and Geosciences: Bioinformatics (IBG-4), Forschungszentrum Jülich, 52425 Jülich, Germany. ⁴Institute of Biological Information Processing: Structural Biochemistry (IBI-7), Forschungszentrum Jülich, 52425 Jülich, Germany. ⁵Institut Für Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany. ✉email: georg.groth@hhu.de

HMA	Heavy metal-transporting ATPase
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
IMAC	Immobilized metal ion affinity chromatography
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
MD	Molecular dynamics
MDS	Microfluidic diffusional sizing
MM-GBSA	Molecular mechanics/generalized born surface area
MST	Microscale thermophoresis
n.s.	No significance
nanoDSF	Nano differential scanning fluorimetry
NHS-ester	N-Hydroxysuccinimide
NMR	Nuclear magnetic resonance
PAE	Predicted alignment error
PDB	Protein data bank
pLDDT	Predicted local distance difference test
RAN1	Responsive to antagonist 1
RMSD	Root-mean-square deviation
ROS	Reactive oxygen species
s.d.	Standard deviation
SEC	Size exclusion chromatography
SOD	Superoxide dismutase
SPR	Surface plasmon resonance
TEV	Tobacco etch virus
TIP3P	Transferable intermolecular potential with 3 points
Tris/HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride
UV	Ultraviolet

The redox-active transition metal copper is essential for a variety of cellular functions. Since copper ions can exist and switch between different redox states, the metal is typically found in enzymes such as amine oxidases¹, proteins of the respiratory electron transport chain², and in certain receptors responsible for the detection of gaseous molecules^{3–4}. In plants, copper ions take on additional tasks as cofactors of photosynthetic protein complexes or sensors of the plant hormone ethylene⁴. More importantly, copper here is also an essential cofactor of superoxide dismutase (SOD) which is responsible for the detoxification of reactive oxygen species (ROS)^{5,6}, e.g. in consequence of excess electron transfer in photosynthesis. Common to all organisms, copper ions are often found as electron acceptors and donors in proteins⁷. However, the redox-active properties of copper ions also bear the risk of ROS formation by Haber–Weiss/Fenton reactions⁸ which in turn can lead to oxidative damage of cell components⁹.

To avoid these detrimental side reactions, intracellular copper levels and copper transport have to be tightly regulated. Hence, many organisms have evolved copper chaperones to bind and shield copper ions while they are transported to their final target site^{10,11}. Soluble copper chaperones of the Antioxidant-1 (ATX1) family share an overall similar structure consisting of a ferredoxin-like fold ($\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$) and a conserved MxCxxC motif that acts as a high-affinity tight binding site for monovalent copper ions¹². These affinities are in the attomolar range, which has been confirmed in recent studies on human antioxidant 1 copper chaperone (ATOX1) and yeast ATX1 copper chaperones¹³. As a consequence, virtually no free copper ions are present within a cell, further emphasizing the highly effective regulation of free copper in cells¹⁴. Soluble copper chaperones are presumed to predominantly accept and release their metal cargo to specific targets such as membrane-bound heavy metal-transporting ATPases (HMAs). The interaction between the soluble chaperones and their dedicated targets is proposed to be accomplished by opposing surface charge distributions that are conserved between interaction partners^{10,15}. In plants, direct interactions of ATX1-like chaperones with membrane transporter HMA7 (also known as RAN1) and HMA5 have been previously shown.

Recent studies in our lab revealed that ATX1-like chaperones also directly interact with the ethylene receptor family, a major group of copper proteins in plants^{16–18}. A unique feature of vascular plants is that they possess two isoforms of soluble copper chaperones, ATX1 and CCH^{18,19}. The two isoforms differ by the C-terminal extension in CCH of about 40 amino acid residues, but otherwise both share the same homology to other ATX1-like proteins in the N-terminal domain¹⁹. Complementary roles for both chaperones have been suggested based on transcription studies at different copper stresses in *A. thaliana*. Both chaperones were shown to be inversely regulated in plants grown in a medium containing either 50 μ M CuSO₄ (excess copper condition) and in plants grown in a medium containing 50 μ M of the Cu(I)-specific chelator bathocuproine disulfonate (BCS) (copper deficiency conditions), respectively²⁰. Further analyses disclosed that an intact MxCxxC metal binding motif and tight regulation of expression are required for maintaining plant copper homeostasis by ATX1, while CCH does not seem to act in a similar manner²¹ and is thus assumed to play a critical role in intercellular rather than in intracellular copper transport²². Structural analyses by far-ultraviolet (UV) and circular dichroism (CD) spectroscopy on full-length CCH and CCH subdomains propose that the chaperone indeed consists of two structurally independent domains with the isolated C-terminus being prone to temperature-induced changes in secondary structure²³. Further structural analysis showed that the isolated C-terminus is able to form amyloid-like fibrils via ionic self-complementation²⁴. Sequence-based secondary structure predictions propose that the C-terminus adopts an α -helical structure, whereas experimental studies by CD spectroscopy on a peptide derived from the C-terminal sequence point to a β -sheet conformation with amphipathic properties able to

form macromolecular complexes by ionic complementation^{23,24}. Up to now, structural information of the CCH C-terminal domain were exclusively obtained with the isolated domain or a short peptide corresponding to this domain, but not on full-length CCH. This raises the question, if the C-terminal domain follows the same structural, biochemical, and biophysical characteristics in the intact full-length protein.

To address this question, we studied full-length CCH and CCH Δ —a truncation mutant lacking the C-terminal extension. To this end, copper chaperones CCH and CCH Δ from *Arabidopsis* were expressed in *Escherichia coli*, purified to homogeneity and used for in vitro structural and interaction studies. In order to gain detailed structural information, solution nuclear magnetic resonance (NMR) studies on [U -¹³C, ¹⁵N]-labeled full-length CCH were performed. Purified proteins were further analyzed by microscale thermophoresis (MST) and absorption spectroscopy for their ability to form complexes/dimerize in a copper-dependent manner and for their copper binding properties. Finally, molecular simulations and free energy computations were performed using structures based on predictions by the deep learning-based algorithm *AlphaFold*^{25,26} to provide atomistic-level insights for the experimental findings.

Results and discussion

Solution NMR spectroscopy of CCH

To gain structural information on the C-terminal extension, solution NMR studies on full-length CCH were performed. From these studies backbone assignments for Cu(I)-CCH and apo-CCH were obtained. Unfortunately, signals of the copper binding motif MxCxxC were broadened beyond detection in these studies, most likely due to structural dynamics on an intermediate timescale and ligand exchange in this region or partial oxidation of the metal ion and formation of Cu(II), which would be paramagnetic and therefore broaden NMR of residues nearby. The biggest chemical shift changes upon chelating the Cu(I) ion were found in helix $\alpha 2$ following the MxCxxC motif (Fig. 1). Still, signals corresponding to the C-terminus were fully assigned and showed no significant difference between the Cu(I)-loaded and apo-state (Fig. 2a). The N-terminal region of CCH is structured and exhibits a secondary structure pattern similar to available structures of homologs (e.g., yeast ATX1), although helix $\alpha 1$ seems to be longer in CCH as seen by secondary chemical shifts analysis (Fig. 2b). In contrast, the signals for the C-terminal extension point for an overall unstructured domain, regardless of the addition of copper. Further, we compared the signal intensities in the ¹H-¹⁵N HSQC spectra of the apo and the Cu(I)-bound state. For the C-terminal region, signal intensities stay nearly unchanged for the Cu(I)-bound and the apo form ($I_{\text{Cu(I)}/I_{\text{apo}}}$ ratios close to 1), indicating no direct involvement of the intrinsically disordered C-terminal domain in Cu(I) binding. However, we observe a significant decrease in intensities for the N-terminal domain upon Cu(I) binding ($I_{\text{Cu(I)}/I_{\text{apo}}} < 1$, Fig. 2c), indicating an involvement of the globular CCH N-terminal domain in Cu(I) binding. In contrast to previous computational modeling and indirect structural approaches by far-UV and CD spectroscopy on the isolated C-terminus, our solution NMR spectroscopic analyses for the first time provide direct structural restraints of the CCH metallochaperone. The obtained NMR data clearly demonstrate that the C-terminal extension of CCH is intrinsically unstructured, in line with *AlphaFold*^{25,26} 3D structure predictions (see below) and sequence-based disorder analyses as can be seen by the reduced dispersion of the chemical shifts in that region (Fig. 2).

Dimerization of CCH and CCH Δ studied by microscale thermophoresis

Protein interaction studies based on microscale thermophoresis were used to analyze chaperone dimerization. When labeled CCH was titrated with unlabeled CCH, high-affinity binding was observed for the homomeric interaction of both proteins in the apo state with an apparent dissociation constant of $K_D = 18 \pm 6$ nM (Fig. 3a). Interestingly, a similar behavior was observed when labeled CCH Δ was titrated with unlabeled CCH Δ (both chaperones in their apo state). However, a lower affinity constant with an apparent K_D value of 57 ± 9 nM was obtained for this interaction (Fig. 3a). The tighter binding observed for CCH suggests that the C-terminus contributes to dimer formation either directly by interaction with the N-terminus or C-terminus in the interacting monomer or indirectly by stabilization of the chaperone-chaperone interaction site. Direct interaction of both C-termini is supported by previous studies showing fibril formation of the isolated C-terminus²⁴.

Next, we tested the homomeric interaction of both chaperone variants in their copper-loaded state. Here, no binding was observed, neither for CCH nor for CCH Δ (Fig. 3b). Based on these results we conclude that the copper binding site must play an important role in CCH dimer formation. This hypothesis is further supported by previous structural and biochemical work on copper chaperones of the ATX1 family (e.g., human ATOX1) where dimer formation is bridged by a single copper ion connecting the metal binding site in both monomers²⁷. Naturally, dimerization is hampered—as observed in our studies—when both monomers are preloaded and saturated with copper as this would result in direct contact of two copper ions at the dimerization interface and unfavorable coulomb repulsion at this site. To test this idea, protein interaction studies were performed with one monomer in the copper-loaded and the other in the copper-free state. According to our assumption, chaperone-chaperone interaction was restored although with lower affinity. For CCH, the apparent K_D value was shifted to 78 ± 39 nM, for CCH Δ the apparent K_D became 169 ± 51 nM (Fig. 3b). Hence, in both cases, the affinity is lowered by a factor of 3–4 compared to the situation when both variants are in their apo-state. We propose that the observed reduced dimer affinity upon copper binding facilitates interaction of the copper chaperone and subsequent metal transfer to their membrane-bound target.

Copper-dependent interaction has been demonstrated for different types of copper chaperones before, such as the putative nuclear copper chaperone CCP²⁸ or the cytosolic human ATX1 homolog HAH1/ATOX1²⁹. In agreement with the MST binding studies presented in this work, previous studies from our lab³⁰ by microfluidic diffusional sizing (MDS) point to copper-dependent dimerization of CCH. In contrast, these studies did not indicate metal-dependent interaction of CCH Δ as shown here, which may be related to the use of dithiothreitol

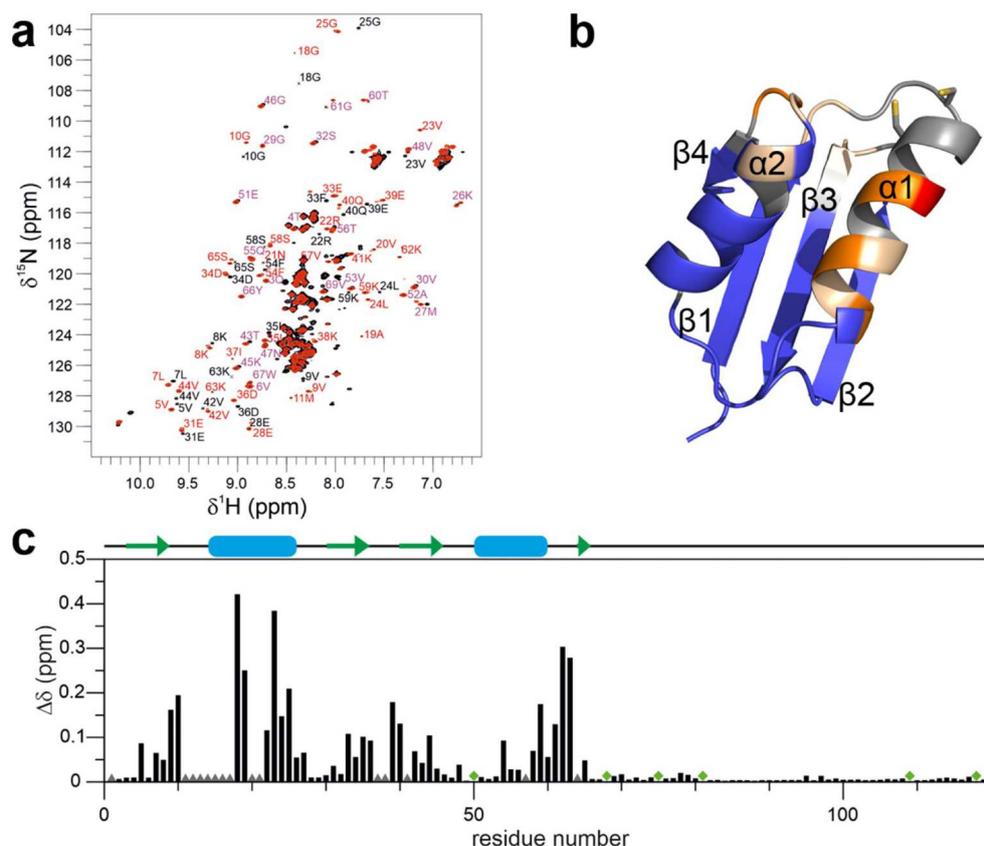


Figure 1. ^1H - ^{15}N HSQC spectra of CCH. (a) NMR spectra of CCH were recorded in the presence (black) and absence of Cu(I) (red). Assignments of the N-terminal domain are indicated in black for signals in the presence of Cu(I), red for signals in the absence of Cu(I) and purple for overlapping signals in both states. (b) Cartoon representation of the CCH Δ model based on the *AlphaFold* CCH model (identifier: **O82089**) showing regions affected by Cu(I) binding in orange shades. The cysteine sidechains are shown as sticks. (c) Weighted ^1H and ^{15}N chemical shift differences, $\Delta\delta$, between resonances from the Cu $^+$ -CCH and apo-CCH are shown. Prolines are marked with a green diamond whereas residues that were broadened beyond detection in at least one state are indicated by a grey triangle. A schematic representation of the secondary structure based on the *AlphaFold* model is presented at the top.

(DTT) in these studies while the MST experiments were run in the absence of DTT. Such DTT dependence of metallochaperone interaction was previously observed³¹ for copper chaperone CopZ from *Bacillus subtilis*, which only dimerizes in the presence of copper when DTT is absent. This is probably because the redox agent can bind to protein-bound copper on its own due to its high affinity for Cu(I)-ions with the apparent K_D -values of DTT for Cu(I) being in the fM-aM range¹³, thereby blocking potential interactions with another chaperone^{32,33}. Studies on apo-ATOX1 revealed that the copper chaperone in the absence of DTT forms dimers when exposed to air³⁴, but stays in the monomeric state when fully reduced and kept under anaerobic conditions. These studies are in line with the dimerization of CCH and CCH Δ in their copper-free state observed by MST. Similar to our results, previous studies on copper chaperone HAH1³⁵ have observed dimerization in a copper-dependent manner and in the copper-free state with a reported apparent K_D for the copper-dependent homodimerization of HAH1 of 6 μM ³⁵ determined by surface plasmon resonance (SPR), which requires immobilization of one of the interacting proteins. In contrast, our interaction studies were performed in solution which could explain the higher dimerization affinities of CCH and CCH Δ due to the lack of steric hindrance introduced by the immobilizing surface required in techniques such as SPR. Still, it cannot be ruled out that dimerization of the chaperones in their apo-state then is owed to oxidation of the copper binding motif or carry-over of the metal ion from the bacterial expression host^{36,37}. The high copper binding affinities in the attomolar concentration range reported for human ATOX1 and yeast ATX1¹³, which probably also apply for the *Arabidopsis* homolog CCH, ensure efficient loading even at trace amounts and transfer of the apo- to the copper-loaded state. To the best of our knowledge the cellular concentration of CCH in *Arabidopsis* has not been determined experimentally yet. Nonetheless, estimates of the cellular CCH concentration based on assumptions and data available in the

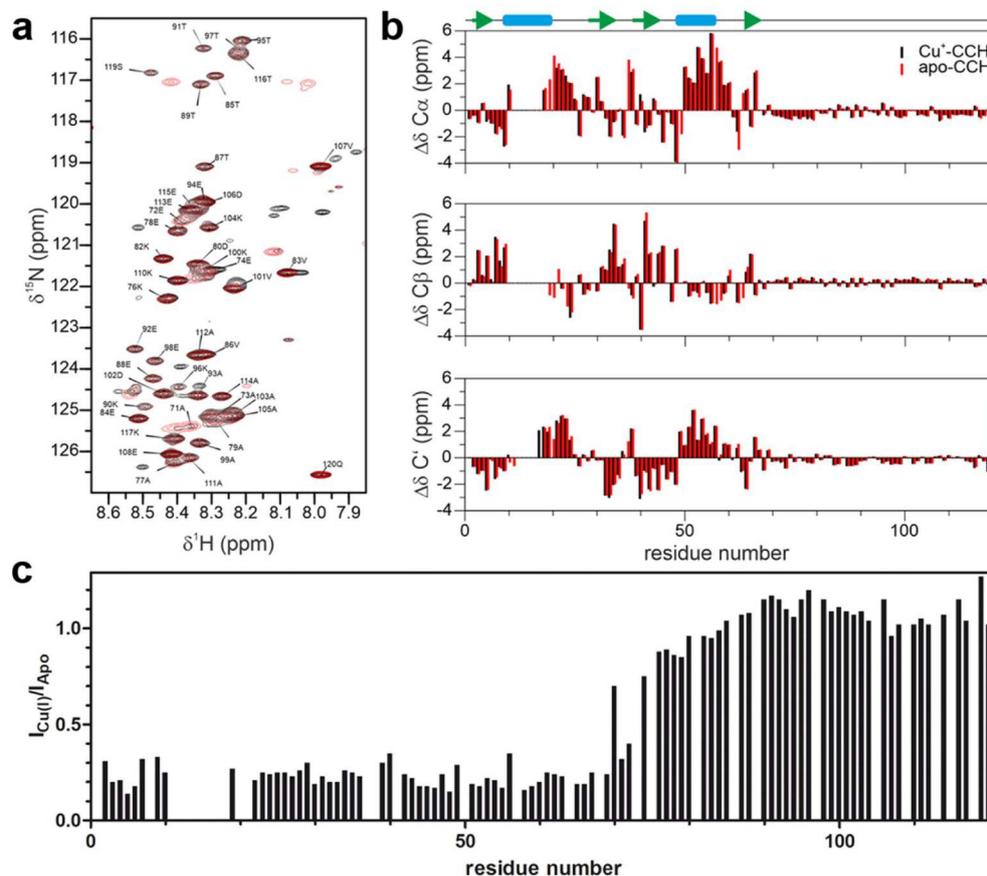


Figure 2. The C-terminal region of CCH is intrinsically disordered. (a) Overlaid ^1H - ^{15}N HSQC spectra of Cu^+ -CCH (black) and apo-CCH (red) show that signals of residues belonging to the C-terminal region show a very low dispersion in the ^1H dimension. (b) C_α , C_β and Carbonyl secondary chemical shifts of CCH. A schematic representation of the secondary structure based on the *AlphaFold* model is presented at the top. (c) The signal intensity ratios in the N-terminal domain of CCH decrease in the $\text{Cu}(\text{I})$ -bound state compared to the copper-free state while the signal intensities in the C-terminal domain stay nearly unchanged indicating no direct involvement of the C-terminal domain in $\text{Cu}(\text{I})$ -binding.

literature^{14,18,19,38} lead us to the conclusion that our data are of physiological relevance due to estimated cellular concentrations of CCH varying between ~ 10 nM to 1000 nM. In this concentration range, monomeric and dimeric forms of the copper chaperones are present, underlining the physiological relevance of our data. The assumptions for the determination of cellular CCH concentrations are explained in more detail in the following chapter and in the "Methods" section.

Estimating the ratio of monomeric and dimeric CCH- and CCH Δ -dimer in the cell

To estimate if the dimerization of the CCH-dimer is dependent on the unstructured C-terminal end, K_D values of CCH ($K_D = 18$ nM) and CCH Δ ($K_D = 57$ nM) were determined experimentally. To our knowledge, no physiological concentration of CCH has been measured in *Arabidopsis thaliana* so far. Therefore, we assumed that the physiological concentration of CCH molecules in the cell is one CCH molecule per 10 to 1000 SOD1 molecules, i.e., the CCH concentration is ~ 10 to ~ 1000 nM. This assumption is based on that for SOD1, the intracellular concentration has been measured in yeast^{14,18,19,38}. In *Arabidopsis thaliana*, SOD1 is present too, and suggested to transport copper to the chloroplast. The chloroplast acts as a Cu storage such that we presume that SOD1 is present in considerably higher concentrations than CCH to fulfill the task. Under such conditions, and considering the equilibrium of dimer-to-monomer transition, between 60 and 9% and 78 and 16% of the CCH- and CCH Δ molecules are predicted to be in a monomeric state. The results show that under these conditions, both the monomeric and dimeric states are present for CCH and CCH Δ . However, the difference corresponds to 18 to 7% more monomeric states for CCH Δ than for full-length CCH. Figure 4 illustrates the chaperone concentration from 10^{-1} to 10^5 nM and the corresponding proportion of monomers for their K_D values. Particularly in the range from 10 to 1000 nM, the amount of CCH Δ monomers is higher than the amount of CCH monomers,

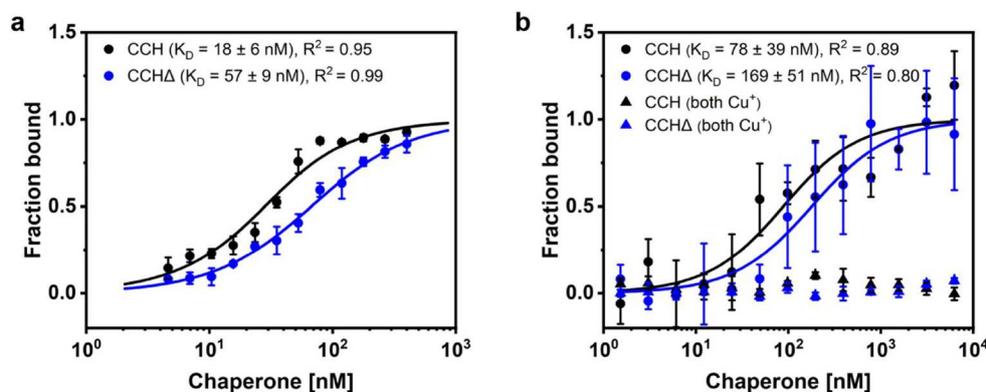


Figure 3. Homodimerization of CCH and CCH Δ under different copper loading states by microscale thermophoresis (MST). (a) Dimerization studies with both interacting proteins in their apo-state revealed an apparent dissociation constant (K_D) of 18 ± 6 nM for CCH and 57 ± 9 nM for CCH Δ . (b) No dimerization was observed when both proteins were in their copper loaded state. Homodimerization was restored when only one monomer was in the copper-loaded state resulting in an apparent K_D of 78 ± 39 nM for CCH and an apparent K_D of 169 ± 51 nM for CCH Δ . Data indicate that the C-terminal extension of CCH is not required for dimerization, but suggest a stabilizing effect on dimerization as higher dimerization affinities were observed for CCH compared to CCH Δ in the apo- and copper loaded state.

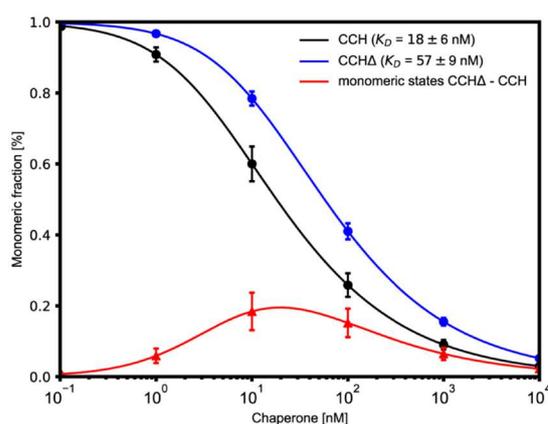


Figure 4. Chaperone concentration and the corresponding fraction of monomeric states of CCH- and CCH Δ -dimers. Under the anticipated physiological conditions of 10 to 1000 nM both the monomeric and dimeric states are present for CCH and CCH Δ . However, particularly in that range, the amount of CCH Δ monomers is up to 20% higher than the amount if CCH monomers, which shows that the different K_D values and thus, the C-terminal end have an impact on the monomeric and dimeric states of the chaperones CCH.

which shows that the different K_D values and, thus, the C-terminal end have an impact on the monomeric and dimeric states of CCH(Δ) under the anticipated physiological conditions. Our results indicate that CCH due to the C-terminal end behaves differently than CCH Δ in the assumed range of physiological concentrations and, thus, presumably also than its homolog ATX1. This might explain, why CCH and ATX1 are hypothesized to function differently and, therefore, also perform different tasks in the cell¹⁸.

Influence of the C-terminal extension on protein stability

To further support the hypothesis of a stabilizing effect of the C-terminal extension, nano differential scanning fluorimetry (nanoDSF) was used to study protein stability in the presence and absence of copper, free bicinchoninic acid (BCA), and the redox reagent DTT. Statistical analysis shows a significant increase in the melting temperature (T_m) of CCH and CCH Δ by copper (Fig. 5, Table 1 and Supplementary Fig. S1 online), which increases from 55.9 °C (samples without DTT) to 60.4 °C (CCH) and 57.2 °C (CCH Δ). The increase in the melting temperature of CCH is significantly ($p \leq 0.0001$) stronger than that of CCH Δ compared to the melting temperatures of the individual proteins in the absence or presence of DTT, clearly demonstrating a positive effect of the C-terminal extension on protein stability. To exclude stabilization of copper chaperones by

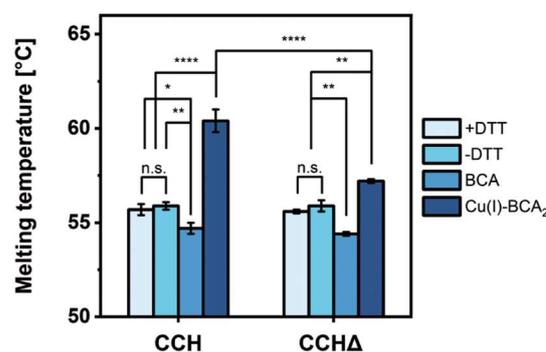


Figure 5. Graphical representation of melting temperatures of CCH and CCHΔ under different conditions obtained by nanoDSF. Significant increases in the melting temperatures of CCH and CCHΔ were observed in the presence of copper. The melting temperature CCH increases significantly more than that of CCHΔ in the presence of copper demonstrating a stabilizing effect of the C-terminal extension. No significant differences were found for chaperones treated with DTT (+ DTT) compared to the non-treated (-DTT) samples. Error bars represent the standard deviation (s.d.) of the mean of technical triplicates (n = 3). Asterisks indicate significance levels determined by two-way analysis of variance (ANOVA) and pairwise multiple comparisons using the post-hoc Bonferroni test (no significance (n.s.), $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.0001$ (****)).

Additive	Melting temperatures T_m [°C]		n
	CCH	CCHΔ	
+ DTT	55.7 ± 0.3	55.6 ± 0.1	3
- DTT	55.9 ± 0.2	55.9 ± 0.3	3
Cu(I)-(BCA) ₂	60.4 ± 0.6	57.2 ± 0.1	3
BCA	54.7 ± 0.3	54.4 ± 0.1	3

Table 1. Effect of DTT, monovalent copper and free BCA on the melting temperatures of CCH and CCHΔ studied by nanoDSF. Monovalent copper was provided as the chromophoric Cu(I)-(BCA)₂ complex. Melting temperatures (T_m) are given as mean values with their corresponding standard deviation and n represents the number of technical replicates.

the copper ligand BCA, protein stability was analyzed in the presence of BCA only. As can be seen in Fig. 5 and Supplementary Fig. S1 online as well as Table 1, free BCA decreases the stability of CCH and CCHΔ to a similar degree demonstrating that the stabilization observed for samples incubated with the Cu(I)-(BCA)₂ complex is solely due to the copper ion. In contrast, the addition of DTT to the buffer did not alter the melting temperatures of CCH and CCHΔ significantly ($p > 0.05$). Moreover, both proteins show similar melting temperatures in their apo states. Overall, the data obtained by nanoDSF demonstrate a positive effect of the C-terminal extension on protein stability in the presence of copper.

Structural modeling of the CCH- and CCHΔ-dimers

To generate a structural model of the CCH- and CCHΔ-dimers, *ColabFold* 1.5.2³⁹ with default settings was used. To understand the evolutionary relationship of CCH and ATX1 of *A. thaliana*, both were sequentially aligned. The alignment reveals an E -value of 2×10^{-43} , a query coverage of 59%, and a sequence identity of 78%, confirming homology, (Supplementary Fig. S2 online), as mentioned in ref.²¹. To identify homologous structures from other organisms, the BLAST suite^{40,41} was used for a search against the PDB database⁴². This identified homologous structures from *Homo sapiens*, *Oryza sativa*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Thermus thermophilus* with E -values, query coverages, and sequence identities ranging from 2×10^{-9} to 3×10^{-6} , 54% to 46%, and 41% to 39%, respectively. These values, along with several conserved amino acids including the characteristic copper-binding motif (MxCxC) (Supplementary Fig. S2 online), confirm that CCH is a homolog of ATX1 in humans and yeast, as mentioned in refs.^{19,21,43,44}. For the sequence resulting in the lowest E -value (UniProt ID: **O00244**), the PDB structure shows a homodimeric ATX1 complexed with a cadmium ion (PDB ID: **1FE0**)²⁷. However, another homodimer complexed with a copper ion was structurally resolved in the same publication (PDB ID: **1FEE**)²⁷. Additionally, a heterodimeric ATX1 structure matching the UniProt sequence P38636 was found (PDB ID: **2GGP**)⁴⁵. Therefore, the homodimeric ATOX1 complex from humans (PDB ID: **1FEE**)²⁷ and the heterodimeric Ccc2a-ATX1 complex from yeast (PDB ID: **2GGP**)⁴⁵ were used to validate the *ColabFold* models.

Based on the full-length sequence of CCH, *ColabFold* predicted a dimer in which the individual monomers feature the typical ATX1-like fold, but failed to predict dimer structures in which the Cu(I) coordinating residues

Cys13 and Cys16 are facing towards each other as anticipated from homolog structures found in the Protein Data Bank (PDB)⁴² (*Saccharomyces cerevisiae*, Atx1-Cu(I)-Ccc2a complex, PDB ID: 2GGP)⁴⁵, (*Homo sapiens*, COPPER-HAH1, PDB ID: 1FEE)²⁷. The pLDDT (predicted local distance difference test; a per-residue confidence metric) indicates the high accuracy of the models, especially for the residues 1–66 (Supplementary Fig. S3 online). In this region the sequence coverage is high (Supplementary Fig. S3 online), indicating a good structure prediction of the monomers based on evolutionary information. However, the drop in the pLDDT and the sequence coverage for residues 67 and the following indicates that the structural information of the C-terminal part of CCH is not well defined.

To gain further insights into the structure of CCH, predictions were performed using *TopSuite*, a deep-learning meta-server for computational structural biology⁴⁶. *TopDomain*⁴⁷ performs a domain boundary prediction for full-length CCH. A boundary at position 72 with a peak score of 0.85 is predicted. This predicted boundary agrees with the drop of PAE and pLDDT at position 67 in the *ColabFold* models (Supplementary Fig. S3 online). The neural network-based tools for the prediction of disordered regions *TopProperty*⁴⁸ and DISOPRED⁴⁹ show that the C-terminal region of CCH has a high tendency to be disordered (Supplementary Fig. S3 online). Taking the above together, we thus assumed that *ColabFold* fails to predict the correct CCH dimer configuration due to the lack of order in the C-terminus structure. Furthermore, from the structure prediction methods, no information is available if the C-terminus is involved in the formation of the dimer interface, nor if the termini interact with each other or the monomers. However, by omitting residues 72 to 121 of the CCH sequence, models of the CCHΔ-dimer that fulfill the structural arrangement known from the homologs could be generated with *ColabFold* 1.5.2³⁹. The models show the typical ATX1-like folds for the monomers⁵⁰. The PAE (predicted alignment error) and pLDDT indicate a high accuracy of the models, especially for residues 1–66 (Supplementary Fig. S4 online).

To validate the proposed models of the CCHΔ-dimer, they were compared to the human homolog ATOX1 (PDB ID: 1FEE)²⁷. The rank 1-model shows the lowest C_α atom root-mean-square deviation (RMSD) to the crystal structure (0.5 Å). Additionally, the orientation of the side chains known to form the dimer interface is broadly consistent with the homolog, which is particularly true for the residues forming the Cu(I) binding site, Ser12, Cys13, and Cys16. Minor deviations exist for residues Arg22, Lys59, Lys62. No information is available about the orientation of Lys63 as there is a threonine residue in the homolog. For the homolog PDB ID: 1FEE, it was suggested that the bound metal ion together with an intermonomer hydrogen bond network provide the key forces that hold the two monomers together²⁷. Locations of water molecules in the dimer interface were calculated by 3D reference interaction site mode (3D-RISM) and agree with the water positions of the homolog PDB ID: 1FEE (Supplementary Fig. S5 online).

Overall, the model of the CCHΔ-dimer obtained by *ColabFold* and 3D-RISM agrees with the homologs at the level of global structure, indicated by the low C_α RMSD value, and a more detailed level, including the orientation of the residues forming the dimer interface, suggesting a reasonable structural prediction for the CCHΔ-dimer. Finally, the disordered C-terminus from the full-length prediction (residues 72–121) of the CCH dimer was attached to the model of the CCHΔ-dimer to obtain a model for the full-length CCH-dimer. Due to the disordered nature of the C-terminal end, the orientation of the C-terminus in the CCH-dimer model is weakly defined, particularly when compared to the well-defined ATX1-like fold and the dimer interface confirmed by experimental data from a human homolog. Therefore, MD simulations were performed to gain insights into the structural dynamics of the CCH dimer.

Molecular dynamics simulations of the CCH- and CCHΔ-dimers

The dimer models were subjected to molecular dynamics (MD) simulations. For each model, fifty independent replicas were simulated for 200 ns each. The trajectories show a slight C_α atom RMSD drift of 1–3 Å concerning the corresponding starting structure for the respective monomers in the dimer, indicating that the ATX1-like folds remain invariant during the simulations. Two replicas of the CCHΔ-dimer and three replicas of the CCH-dimer show a C_α atom RMSD of the dimer that is similar to that of the monomers (Supplementary Fig. S6 online). There, both monomers coordinate the Cu(I) ion via Cys13 and Cys16, and the hydrogen bond network²⁷ is formed, corresponding to the “closed conformation” of the two conformational states of the copper metallochaperone ATOX1 based on electron paramagnetic resonance (EPR) data⁵¹ as well as EPR data and multiscale simulations⁵² (Supplementary Fig. S7 online). In eight to 24 replicas, the C_α atom RMSD is ~6 Å for the CCHΔ-dimer and the CCH-dimer, respectively, indicating pronounced conformational changes, e.g., that the dimer is mainly held together by the copper-coordinating cysteines but that the hydrogen bond network is largely missing. Such structures correspond to the “open conformation” of the two conformational states of ATOX1^{51,52} (Supplementary Fig. S7 online). Finally, in 23–40 replicas, the C_α atom RMSD reaches at least 10 Å for the CCH-dimer and the CCHΔ-dimer, respectively, due to dimers that dissociated and remain so or the monomers reassemble as a dimer, but in an alternate conformation, in which the respective copper-coordinating cysteines of each monomer do not point to each other, which prevents copper coordination of both monomers, similar to the “back-to-face” conformation⁵³ (Supplementary Fig. S7 online). A trend is emerging that indicates that the CCH-dimer replicas provide more closed and open configurations, in total 27, compared to the CCHΔ-dimer with in total 10 replicas. As to the behavior of the C-termini of the CCH-dimer, no interaction of the C-termini with each other was observed. Either the C-termini are exposed to the solvent or located close to the monomer at the same side as the first β-strand of the ATX1-like fold with certain residues (80–95, and 103–121) showing short distances to the first α-helix (residues 18–25) of the other monomer (Supplementary Fig. S8 online).

To obtain more replicas of the CCH-dimers in the “closed conformation” for subsequently determining the dimer interface, the final structures of replicas 43 and 49 for the CCH- and CCHΔ-dimer, respectively, were each minimized, thermalized, and subjected to production runs of another 10 independent MD simulations of

200 ns length each. In addition, replica 43 features small distances for both residues 80–95 and 103–121 of the C-termini to the dimer interface. This will allow the suggestion of key residues that contribute to the monomer association by a residue-wise decomposition of the binding effective energy (see below). In these extended trajectories, little to no conformational changes are observed (C_{α} atom RMSD 1–4 Å) (Supplementary Fig. S9 online). To generate conformational ensembles of the apo CCH- and CCHA-dimers, the same procedure was applied, but the Cu(I) ions were removed. As for the copper-loaded complexes, the trajectories show little to no conformational changes (C_{α} atom RMSD 1–4 Å) (Supplementary Fig. S9 online).

Residue-wise decomposition of binding effective energies

To identify amino acids in the CCH- and CCHA-dimers that are crucial for dimer stability, molecular mechanics/generalized Born surface area (MM-GBSA)⁵⁴ calculations combined with a decomposition of the effective energy of dimerization on a per-residue level were performed⁵⁵. In the case of the copper-loaded CCH-dimer, 1000 snapshots from the ten extended replicas were used (Supplementary Fig. S9 online). Residues S12, C13, C16, A19, N21, R22, V23, K26, G61, and Cu(I) in the ATX1-like fold show $\Delta G_{\text{gas} + \text{solv}} < -1.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ and contribute favorably to the binding effective energy of the complex. In the disordered C-termini, T116 and K117 of one monomer contribute favorably to the binding effective energy with $\Delta G_{\text{gas} + \text{solv}} < -1.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Fig. 6a, e). In the case of the loaded CCHA-dimer, 1000 snapshots from eight extended replicas were investigated (Supplementary Fig. S9 online). Less than half of the residues identified for the CCH-dimer (C13, C16, A19, G61, and Cu(I)) show $\Delta G_{\text{gas} + \text{solv}} < -1.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Fig. 6b,f) now. In the case of the apo CCHA-dimer, 1000 snapshots from six extended replicas were investigated. Residues G15, A19, N21, R22, V23, K26, G61, K62, T95, T116, K117, and V121 show $\Delta G_{\text{gas} + \text{solv}} < -1.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Fig. 6c,e). C13 and C16 are no longer binding “hot spots” due to the missing Cu(I) but additional residues in the C-terminus (T95, V121) now contribute favorably compared to the copper-loaded state. In the case of the apo CCHA-dimer, 1000 snapshots from eight extended replicas were investigated. Residues T60 and G61 show $\Delta G_{\text{gas} + \text{solv}} < -1.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Fig. 6d,f). As for the apo CCH-dimer, C13 and C16 are no longer binding “hot spots”. Due to the lack of the C-termini, there is no compensation by such residues possible.

Copper binding of CCH and CCHA

To substantiate that the C-terminus has no direct impact on the metal binding site in the CCH N-terminal domain, copper binding of CCH and CCHA was studied with chromophoric copper-bicinchoninic acid complex Cu(I)-(BCA)₂. The observed decrease in absorption at increasing concentrations of CCH and CCHA indicates that chaperones and high affinity ligand BCA compete for monovalent copper and that copper is transferred onto the soluble chaperones (Fig. 7). Similar changes were observed for CCH and CCHA especially at lower chaperone concentrations leading to the conclusion that the C-terminal extension has no or only a minor effect on copper binding efficiency. This conclusion is in line with the previously shown solution NMR experiments where no significant differences in the structure of the C-terminus were observed in the presence and absence of copper.

Conclusion

Previous structural analysis of CCH and its C-terminal extension focused on isolated domains and short peptide sequences derived from the C-terminal extension. In contrast, the solution NMR-data in this study provide for the first time restraints and offer structural insights into the full-length protein. They demonstrate that the C-terminal extension is intrinsically disordered and further reveal that copper has no detectable influence on the structure of this extension. These new findings are in line with structure predictions by the deep learning algorithm *AlphaFold* and are further complemented by in vitro and in silico CCH dimerization studies in this work. From domain identification, structure, and disorder prediction, the C-terminal end is likely disordered. A per-residue decomposition of the binding effective energy revealed that residues in the dimer interface also known from homologous dimers predominantly determine the monomer association^{27,45}. Residues involved in copper binding contribute in the copper-loaded state as do residues T116, K117, and V121 in the C-terminus. The latter are part of a group of residues that shows short distances in unbiased MD simulations of the CCH-dimer to the first α -helix of the other monomer. The influence of the C-terminal extension was also evident in the melting temperature analysis, which demonstrated that the melting temperature of CCH increased more than that of CCHA in the presence of copper. Our computational results are in line with experimental data that showed that CCH-dimer formation is more favorable in the presence of the C-termini (Fig. 3). Complementary biophysical studies on CCH interaction revealed tighter interaction of the monomers in the CCH dimer compared to the corresponding CCHA complex. Based on these findings, we propose an indirect effect of the C-terminal extension on the dimerization due to the stabilization of the dimer interface. The physiological function of chaperone dimerization might consist in an additional-shielding of the bound hazardous copper cargo providing another safety layer in the proposed long-range intercellular transport of monovalent copper by CCH²². In addition, dimerization may also protect the chaperone metal binding motif from unfavorable side reactions (e.g., oxidation). Our data suggests that CCH exhibits a distinct dimerization behavior compared to CCHA, and probably also differs from its homolog ATX1, due to the C-terminal end. This aligns with the hypothesis that CCH and ATX1 have distinct functional roles, potentially performing different tasks within the cell¹⁸. The reduced dimerization affinity of CCH and CCHA in the copper-loaded state may ensure further interaction and copper transfer from the soluble chaperone to their membrane target. The precise nature and the molecular mechanism of the proposed indirect impact of the C-terminus on dimerization, however, could not be identified by the methods used in this study and require further analysis. Nevertheless, the experiments performed in this study demonstrate that the C-terminus of CCH is intrinsically disordered in the full-length

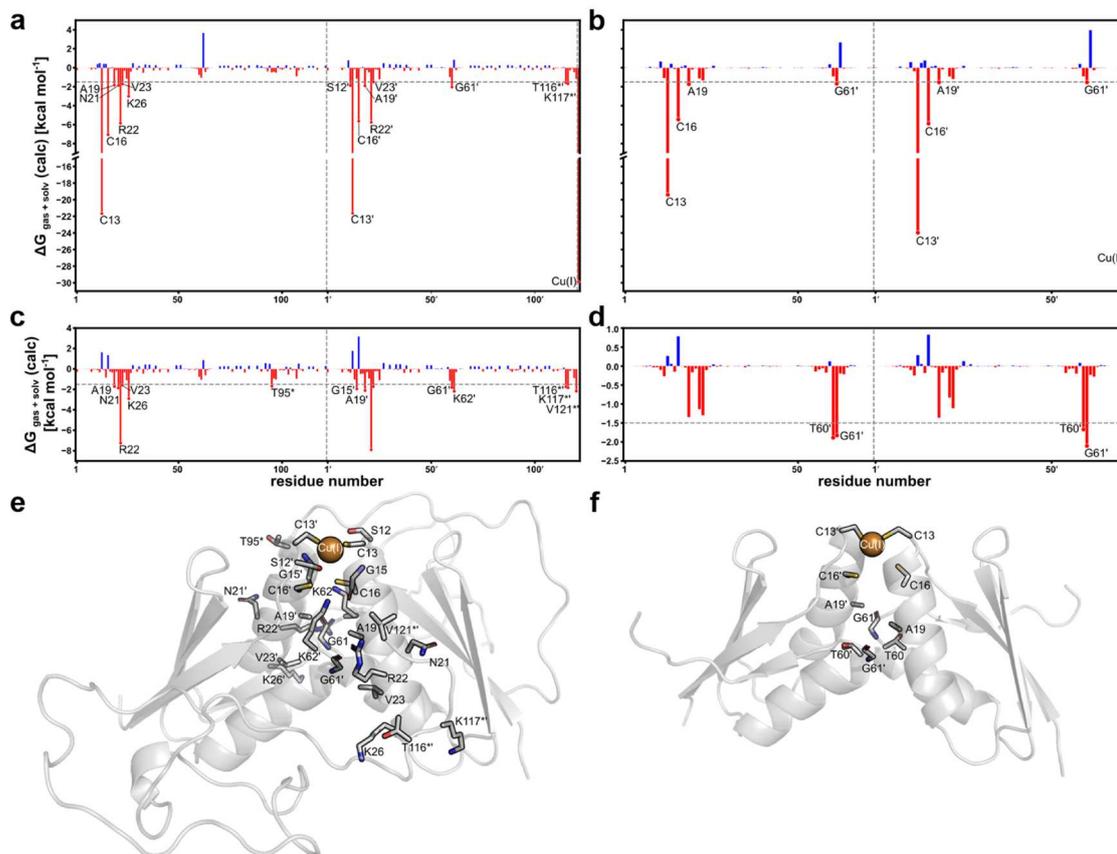


Figure 6. Identification of amino acids in CCH- and CCH Δ -dimers that are crucial for dimer stability. (a) Per residue decomposition of the binding effective energy of the Cu(I)-loaded full-length CCH-dimer. Residues contributing to the dimerization with $\Delta G < -1.5$ kcal mol $^{-1}$ are considered hot spots and are indicated in the graphic by red dots. Residue numbering is according to the full-length CCH monomer (UniProt code: **O82089**). The dotted line separates the two protomer chains. The residues of the C-termini are marked by *. Residues discussed in the text are labeled. The relative standard error is $< 2.5\%$ of the corresponding hot spot mean. (b) Same as in (a) for the Cu(I)-loaded CCH Δ -dimer. (c) Same as in (a) for the apo full-length CCH-dimer. (d) Same as in (a) for the apo CCH Δ -dimer. (e) Hot spot residues localized on the full-length CCH-dimer. (f) Hot spot residues localized on the CCH Δ -dimer. The energy decomposition revealed that favorable polar contributions to the solvation free energy occur around the Cu(I) ion and involve residues C13 and C16. R22 is also part of the hydrogen bond network and shows favorable contributions of electrostatic interactions since the guanidino group of the side chain forms a hydrogen bond with the carbonyl oxygen of G61 of the opposite monomer. The remaining polar (N21, K26) and nonpolar (A19, V23) amino acids are in the dimer interface but do not participate in the hydrogen bond network. They contribute to the stability of the dimer mainly due to van der Waals interactions and to a smaller extent through non-polar contributions to the solvation free energy, as do residues T95, T116, K117, and V121 located at the C-terminal end of CCH.

protein and is not involved in Cu(I)-binding but affects the dimerization behavior of this copper chaperone and therefore potentially its cellular function.

Methods

Recombinant proteins CCH and CCH Δ were expressed and purified as previously described¹⁷. The vectors used to do so consist of the coding sequence of CCH (TAIR: **AT3G56240.1**) for amino acids 1–120 for full-length CCH or for amino acids 1–70 for CCH Δ . Proteins are fused to an N-terminal 10xHis-tag, followed by a tobacco etch virus (TEV) protease cleavage site for His-tag removal after affinity purification. His-tag removal and loading of purified copper chaperones with monovalent copper was also performed as previously described¹⁷. In short, copper chaperones were purified by immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC). His-tag removal was achieved by the digestion of copper chaperones with TEV-protease prior to the final purification step by size exclusion chromatography (SEC). For NMR experiments a Superdex™ 200 (GE Healthcare, Illinois, USA) was

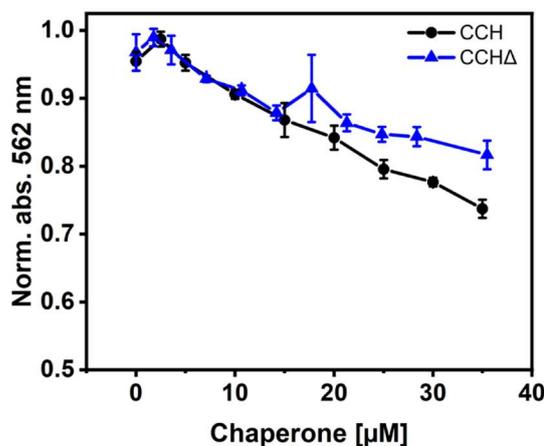


Figure 7. Titration of Cu(I)-(BCA)₂ with CCH and CCHΔ. A fixed concentration of the chromophoric Cu(I)-(BCA)₂-complex was titrated with different concentrations of copper chaperones CCH and CCHΔ in the same final volume and absorbance at 562 nm was monitored. A decrease in absorbance at increasing chaperone concentrations indicates removal of copper from the Cu(I)-(BCA)₂-complex due to copper binding at CCH or CCHΔ, respectively.

used whereas otherwise a Superdex Increase 75™ 10/300 GL (Cytiva, Marlborough, USA) was used. For copper binding studies an additional purification step was included. His-tags were removed by overnight incubation with TEV-protease at 4 °C in a 1/70 molar ratio in buffer A (300 mM NaCl, 50 mM 2-[4-(2-Hydroxyethyl) piperazin-1-yl]ethane-1-sulfonic acid (HEPES), 10% (w/v) glycerol, 1 mM (DTT), pH 7.0–7.5). TEV-protease and uncleaved chaperones were removed by reverse IMAC on a ÄKTAPrime plus system (GE Healthcare) using a 5 ml HisTrap FF column (Cytiva, Marlborough, USA) equilibrated in buffer A. Flow-through fractions were collected and cleaved chaperones were eluted using 20 mM Imidazole in buffer A. Fractions were then pooled and concentrated to a final volume of 0.5 ml using Amicon Ultra-15 centrifugal filter units (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) with a molecular weight cut-off of 3 kDa. Imidazole, protein aggregates and TEV-protease were removed by gel filtration using a Superdex™ 75 Increase size exclusion chromatography column (Cytiva, Marlborough, USA) equilibrated with degassed SEC buffer (300 mM NaCl, 50 mM HEPES, pH 7.5). Elution fractions were pooled, concentrated as described above and protein concentration was determined based on the absorbance at 280 nm. Chaperones were adjusted to 20% (w/v) glycerol, shock frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. All purification steps were carried out at 4 °C. For NMR-experiments, freshly prepared protein without the addition of glycerol was used. Buffers were prepared from ultrapure water with a conductivity of 0.055 μS/cm.

Copper binding of chaperones

For analysis of copper binding abilities of CCH and CCHΔ, chaperones were incubated for 1 h at 4 °C with a 20-fold excess of DTT over protein in a reaction volume of 0.5 ml in degassed SEC buffer. DTT was then removed by buffer exchange into degassed SEC buffer using a PD MiniTrap desalting column (Cytiva, Marlborough, USA). Protein concentration was determined via absorbance at 280 nm and a titration series of protein in SEC buffer was prepared ranging from 0 to 100 μM depending on the protein concentration in a volume of 50 μl. Afterwards, 50 μl of Cu-buffer (300 mM NaCl, 50 mM HEPES, 100 μM BCA, 40 μM CuCl, 2 mM Na-ascorbate, pH 7.5) were added to the protein dilution series and absorbance at 562 nm was measured. All measurements were performed in triplicates at room temperature.

Fluorescent labeling of purified chaperones

Interaction studies using microscale thermophoresis (MST) require labeling one of the interaction partners with a fluorescent dye. Therefore, CCH and CCHΔ, purified as previously described¹⁷, were labeled with the amine reactive dye Alexa Fluor™ 488 N-hydroxysuccinimide (NHS) ester by adding the threefold amount of dye in relation to protein in SEC buffer. Afterwards the reaction mixture was incubated for 1 h in the dark on a rotary shaker followed by the addition of a 1000-fold excess of a Tris/HCl pH 8.0 solution to quench the reaction. For experiments involving copper, TEV-protease (1/70 protease to chaperone ratio) and DTT at a final concentration of 1 mM were added followed by overnight incubation in the dark at 4 °C. Finally, Cu(I)-(BCA)₂ was slowly added until the solution stayed colored and a sample volume of 0.5 ml was loaded on a Superdex™ 200 Increase 10/300 GL size exclusion chromatography column equilibrated in SEC buffer to remove excess dye, Cu(I)-(BCA)₂ and TEV-protease¹⁷. Elution fractions were pooled, concentrated and protein concentration was determined as described above.

Microscale thermophoresis

Interaction studies were performed on a Monolith NT.115 using premium capillaries (NanoTemper Technologies, Munich, Germany). Measurements were done in triplicates with MST power set to 70% and LED power set to 95%. Prior to use, all protein stock solutions were adjusted to 0.05% (w/v) Tween-20 and all dilutions were made with MST buffer (300 mM NaCl, 50 mM HEPES, 0.05% (w/v) Tween-20, pH 7.5). In all measurements, labeled chaperones were diluted to a final concentration of 20 nM. For studying unloaded CCH-CCH and CCHΔ-CCHΔ homomeric protein interactions, a 2:1 dilution series of unlabeled protein ranging from 4.6 to 400 nM was prepared. For studying the protein interaction of chaperones preloaded with copper, dilutions of unlabeled chaperone from 1.5 to 6.25 μM were prepared. For studying homomeric CCH-CCH and CCHΔ-CCHΔ chaperone interaction with only one of the interaction partners pre-loaded with copper, copper loaded and labeled CCH was added to unlabeled CCH ranging from 0.4 to 6.25 μM. Accordingly, labeled CCHΔ was added to copper-loaded and unlabeled CCHΔ ranging from 0.4 to 6.25 μM. Equal volumes of the labeled chaperone and the corresponding dilution series were mixed resulting in the final concentrations given above. Samples were incubated for 10 min at room temperature in the dark prior to the measurement. Data were fit to a one-site binding model using the MO.Affinity Analysis software v2.1.5 (NanoTemper Technologies).

Protein stability analysis by nanoDSF

Protein stability of CCH and CCHΔ was analyzed using the label-free nanoDSF method on a Prometheus NT.48 instrument (NanoTemper Technologies, Munich, Germany). All experiments were performed in triplicate at protein concentrations of 120 μM in SEC buffer. For experiments involving copper, samples additionally contained 30 μM CuCl₂, 75 μM BCA and 600 μM Na-ascorbate. Experiments analyzing the effect of the free copper ligand BCA on copper chaperone stability contained 75 μM BCA and 600 μM Na-ascorbate. In order to address the effect of the redox state on protein stability, melting temperatures (T_m) were analyzed in the presence of 0.5 mM DTT and the absence of DTT. Samples did not contain DTT unless stated otherwise. Prior to the measurements, samples were transferred to nanoDSF-grade standard capillaries (NanoTemper Technologies, Munich, Germany). The start and end temperatures were set to 20 °C and 95 °C with an increase in temperature by 1.0 °C/min. The excitation power was set to 40% for samples with and without DTT and 70% for samples containing either the Cu(I)-(BCA)₂ complex or the free BCA ligand due to lower signal intensities. The unfolding of proteins was monitored by calculating the fluorescence emission ratio at 330 nm and 350 nm and melting temperatures were determined from the inflection point of these ratios by the PR.ThermControl software (NanoTemper Technologies, Munich, Germany). Differences in melting temperatures were statistically analyzed by two-way ANOVA followed by pairwise multiple comparisons of means using the Bonferroni test.

Isotope enrichment of CCH and NMR spectroscopy

Cells of *E. coli* strain BL21 (DE3) were transformed with the expression vector pTEV16b-CCH. Liquid 2YT media (100 ml) was inoculated with a single colony and grown overnight at 37 °C and 180 rpm. Cells were harvested by centrifugation at 7,500 × g for 15 min and the resulting pellet was resuspended in 30 ml M9 media supplemented with ¹⁵N-ammonium chloride and ¹³C-glucose. 6 × 500 ml M9 media supplemented with ¹⁵N-ammonium chloride and ¹³C-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 was induced by the addition of 0.5 mM Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Cells were harvested after 14 h of expression by centrifugation at 7500 × g for 20 min and stored until purification at -20 °C. Purification was carried out as described for unlabeled CCH¹⁷. NMR samples of apo-CCH contained 0.7 mM [¹³C, ¹⁵N]-CCH supplemented with 10 mM DTT added as a reducing agent, which would also chelate and deplete any residual copper that may have been carried over from the bacterial purification host, whereas Cu(I)-CCH samples contained 0.5 mM [¹³C, ¹⁵N]-CCH supplemented with an equimolar amount of Cu(I) as Cu(I)-(BCA)₂ in 50 mM HEPES (pH 7.25) and 50 mM NaCl. For all experiments, 5 mm symmetrical Shigemi NMR tubes (BMS-005B) were used. NMR spectra were recorded at 25 °C on Bruker Avance III HD NMR spectrometers operating at 700 MHz and 750 MHz ¹H Larmor frequencies equipped with cryogenically cooled TCI probes, as well as on a Bruker Avance III HD NMR spectrometer operating at 800 MHz equipped with a cryo-¹³C-TXO probe. The spectrometers were manually tuned and matched manually using the Bruker Tuning Module (ATMM) and shimmed using the TopShim routine. NMR samples contained [¹³C, ¹⁵N] or [¹³C, ¹⁵N]-CCH in 50 mM HEPES (pH 7.25) and 50 mM NaCl supplemented with either 10 mM DTT or equimolar amounts of Cu(I) as Cu(I)-(BCA)₂. Sequence-specific backbone assignments were obtained using band-selective excitation short-transient-transverse relaxation-optimized spectroscopy (BEST-TROSY) experiments⁵⁶, Hadamard-encoded amino acid type editing (HADAMAC)⁵⁷ and ¹³C-detected (H)CANCO and (H)CANCOi experiments⁵⁸. NMR data were processed using NMRPipe⁵⁹ and analyzed with CcpNmr⁶⁰. The weighted chemical shift changes, Δδ(H,N), were calculated using the following Eq. (1):

$$\Delta\delta(^1H, ^{15}N) = \sqrt{\Delta\delta(^1H)^2 + \frac{\Delta\delta(^{15}N)^2}{25}} \quad (1)$$

Secondary chemical shifts were calculated on the basis of random-coil chemical shifts and corrected for next neighbor effects^{61,62}.

Structure prediction and molecular dynamics simulations of CCH dimers

To examine the evolutionary relationship of CCH from *A. thaliana* and its homologs in yeast and humans, the BLASTp (Basic Local Alignment Search Tool for proteins) server^{40,41} was employed. The full-length sequence

of CCH from *A. thaliana* was obtained from the UniProt database (UniProt ID: O82089) and used as the query sequence. First, it was aligned with the amino acid sequence of ATX1 from *A. thaliana* (Uniprot ID: Q94BT9) using default parameters for homology assessment. Second, the query sequence was used to search against the PDB database⁴² using an expect threshold of 0.05, a word size of 3, a BLOSSUM80 matrix, and gap costs of 8 for existence and 2 for extension. The alignments were visualized using Jalview 2⁶³, including all sequences with an *E*-value < 10⁻⁴. The CLUSTAL color scheme was used, and a diagram of sequence conservation and the consensus sequence were depicted. The homologous structures found were used to validate the ColabFold models created below.

No experimental 3D structure is currently available for CCH of *A. thaliana*. However, a structural model is available within the AlphaFold database²⁵ (identifier: O82089)⁶⁴. To generate a structural model of the corresponding CCH-dimer, ColabFold 1.5.2³⁹ with default settings was used. Residues 72 to 121 of the CCH sequence were omitted to build CCH- and CCHΔ-dimers since, based on the entire sequence, ColabFold failed to predict structures in which the cysteines 13 and 16 are facing towards each other as anticipated from homologous structures in the Protein Data Bank (PDB)⁴² (*Saccharomyces cerevisiae*, Atx1-Cu(I)-Ccc2a complex PDB ID: 2GGP)⁴⁵, (*Homo sapiens*, COPPER-HAH1 PDB ID: 1FEE)²⁷ (Supplementary Figs. S3 and S4 online).

We further assessed the CCH- and CCHΔ-dimers in the presence of the cofactor Cu(I) by unbiased molecular dynamics (MD) simulations. Since soluble copper chaperones such as CCH feature a similar structure consisting of a ferredoxin-like fold and a copper-binding motif (MxCxxC)^{27,50}, the Cu(I) ion was placed between the sulfur atoms of cysteine residues Cys13 and Cys16 of the copper binding motif in the dimer, corresponding to the copper position in the homologs. The protein structures were further prepared and protonated using Maestro⁶⁵ with pH 7.4 to mimic physiological conditions. The protonation states of the cysteines in the copper binding site were defined based on the homologs, too. According to PDB ID: 1FEE, the dimer interaction is enhanced by an extended hydrogen bonding network, including two water molecules. When the hydrogen bonding network in PDB ID: 1FEE is applied to CCH, one water molecule is located between the two sulfur atoms of cysteines Cys16_A and Cys16_B. This water molecule also forms hydrogen bonds to Lys62_A and Lys62_B. Therefore, Cys16_B is also assumed to be deprotonated. Additional hydrogen bonds connect Lys62_A, Lys62_B, a second water molecule, and the carbonyl oxygens of Thr60_A and Thr60_B. Potential positions of water molecules in the dimerization interface were determined using 3D-RISM in AmberTools21^{66,67}. The obtained structures were solvated in a rectangular box of transferable intermolecular potential with 3 points (TIP3P) water⁶⁸ with a distance of at least 12 Å between the box edge and the protein. K⁺ ions were added as counterions in the solvation box. Counterions and copper were treated with the 12-6-4 non-bonded model⁶⁹. The graphics processing units (GPU) particle mesh Ewald implementation from the AMBER22 molecular simulation suite⁷⁰⁻⁷² with the ff14SB⁷³ parameters for the protein were used.

The solvated systems were thermalized by carrying out a mixed steepest descent/conjugate gradient minimization with in total 50,000 steps, 50 ps of heating, and 50 ps of density adaptation with weak positional restraints on the protein's atoms (2 kcal mol⁻¹ Å⁻²) followed by an MD simulation under NPT conditions at 300 K for 4.9 ns. Covalent bonds to hydrogens were constrained using the SHAKE algorithm, and hydrogen mass repartitioning was applied which allows a time step of 4 fs^{74,75}. The temperature was maintained by using Langevin dynamics⁷⁶, with a friction coefficient of 2 ps⁻¹. The pressure was maintained using an isotropic Berendsen barostat⁷⁷. Production runs were started using the same setup as in the last step of thermalization. In total, 50 replicas were minimized and thermalized and then simulated for 200 ns each, resulting in a cumulative simulation time of 10,000 ns for both the CCH- and CCHΔ-dimer. The generated trajectories were analyzed using CPPTRAJ⁷⁸ or PYTRAJ of AmberTools⁷⁹.

MM-GBSA computations and free energy decomposition

To gain further insights into the CCH- and CCHΔ-dimer interfaces, effective energy contributions of key residues that contribute significantly to the dimer's binding affinity were identified⁵⁵. For this MM-GBSA⁵⁴ calculations employing the "single trajectory approach" in MMPBSA.py of AMBER22⁸⁰, considering gas-phase energies and solvation free energies but not configurational entropies⁵⁵, were performed. The MM-GBSA calculations were based on 1000 snapshots extracted from the last 100 ns of equilibrated trajectories and performed using a modification on the "GBn" model (igb = 8) together with recommended radii set mbondi3. All counterions and water molecules were stripped, except the Cu(I) ion, whose radii were set to 1.4 Å⁸¹. To ensure an even distribution of the effective energy contributions of individual residues in both monomers, two cycles of calculations were performed, each time assigning the Cu(I) ion to a different monomer, with the results of both calculations being averaged. The contributions on a per-residue basis to the overall effective energy (i.e., sum of gas-phase plus solvation free energy) of dimerization are presented as ΔG_{gas,solv} averaged over the total of equilibrated independent trajectories. To display hot spots of the corresponding CCH-dimers, representative CCH-dimer structures were obtained by structural clustering.

CCH-dimer and CCHΔ-dimer versus monomer populations

The dimer-to-monomer equilibrium results from the following equilibrium:



where D and M represent the CCH(Δ)-dimer and monomer respectively, with K_D being the dimer dissociation constant, obtained from the experiment. Based on the measured dissociation constant of the CCH-dimer K_D = [M]²/[D] = 18 nM and the CCHΔ-dimer K_D = [M]²/[D] = 57 nM, with [D] and [M] as concentrations of

dimer and monomer, respectively, the proportion of CCH(Δ)-dimer versus monomer in the cytosol of a cell can be calculated. To our knowledge, no in vivo CCH concentration has been measured so far; thus, we assume a concentration range of 10–1000 nM (see below and the "Results" section). An average Cu cell concentration of 6 mg L⁻¹ is considered an appropriate concentration in *A. thaliana*³⁸. This can increase to 20 mg L⁻¹, but there is no experimental evidence that this also increases CCH expression³⁸. This corresponds to a Cu concentration of 9.44×10^4 nM:

$$n[\text{Cu}] = \frac{\text{mass}(\text{g})}{\text{molar mass}(\frac{\text{g}}{\text{mol}})} = \frac{6 \times 10^{-3} \text{g}}{63.55 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 9.44 \times 10^{-5} \text{mol}$$

$$c[\text{Cu}] = 9.44 \times 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L}} = 94400 \frac{\text{nmol}}{\text{L}} = 9.44 \times 10^4 \text{nM}$$

This is consistent with the Cu concentration of 7.0×10^4 nM in *Saccharomyces cerevisiae*¹⁴. The concentration of the copper chaperone superoxide dismutase 1 (SOD1) in *S. cerevisiae* was measured as 10,000 nM¹⁴. As SOD1 is associated with mediating the copper transfer from the plasma membrane to the chloroplast³⁸ and chloroplasts are one of the major Cu accumulation sites³⁸, this suggests that fewer Cu ions need to be transported to the ER, and, accordingly, fewer copper chaperones (ATX1, CCH) mediating the copper transfer from the plasma membrane to the ER are needed. Interestingly, mRNA expression of CCH is increased in the absence of Cu and reduced with excess Cu, whereas ATX1 expression is induced by excess Cu¹⁸. This is in agreement with CCH mRNA expression measurements that suggest that CCH is present at a basal level in roots, stems, flowers, siliques, and leaves¹⁹, whereas SOD1 features high intracellular concentrations¹⁴. Based on this, and under consideration that both organisms feature a similar Cu cell concentration, we assume in the following that the intracellular concentration of CCH in *A. thaliana* is 10 to 1000 times lower than the concentration of SOD1 in *S. cerevisiae*. This results in a total concentration of CCH molecules of 10 to 1000 nM.

$$[T] = 2[D] + [M] = [10, 1000] \text{ nM}$$

Expressing the dissociation constant in terms of the monomer concentration

$$K_D = \frac{[M]^2}{\frac{[T]-[M]}{2}} \Leftrightarrow [M]^2 - \frac{K_D[T]}{2} + \frac{K_D[M]}{2} = 0$$

and solving the quadratic equation results in

$$[M] = \frac{\sqrt{K_D \sqrt{K_D + 8[T]} - K_D}}{4} = [6.0, 90.5] \text{ nM for } K_D = 18 \text{ nM}$$

$$[M] = \frac{\sqrt{K_D \sqrt{K_D + 8[T]} - K_D}}{4} = [7.8, 155.2] \text{ nM for } K_D = 57 \text{ nM}$$

and

$$[D] = \frac{[T] - [M]}{2} = [2.0, 454.8] \text{ nM for } K_D = 18 \text{ nM}$$

$$[D] = \frac{[T] - [M]}{2} = [1.1, 422.4] \text{ nM for } K_D = 57 \text{ nM}$$

The results show that in live cells the fraction of monomeric (dimeric) state is between 60 and 9% (40 and 91%) and 78 and 16% (22 and 84%) for full-length CCH ($K_D = 18$ nM) and CCH Δ ($K_D = 57$ nM), respectively.

Data availability

NMR Data have been deposited at the BMRB under accession codes 50,358 and 50,359 or are available upon reasonable request to the corresponding author.

Received: 2 May 2024; Accepted: 6 August 2024

Published online: 17 August 2024

References

1. Brazeau, B. J., Johnson, B. J. & Wilmot, C. M. Copper-containing amine oxidases: Biogenesis and catalysis; A structural perspective. *Arch. Biochem. Biophys.* **428**, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.03.034> (2004).
2. Tsukihara, T. *et al.* Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* **269**, 1069–1074. <https://doi.org/10.1126/science.7652554> (1995).
3. Duan, X. *et al.* Crucial role of copper in detection of metal-coordinating odorants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 3492–3497. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111297109> (2012).
4. Rodriguez, F. I. *et al.* A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from Arabidopsis. *Science* **283**, 996–998 (1999).
5. Alscher, R. G., Erturk, N. & Heath, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* **53**, 1331–1341 (2002).

6. Tainer, J. A., Getzoff, E. D., Richardson, J. S. & Richardson, D. C. Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase. *Nature* **306**, 284–287. <https://doi.org/10.1038/306284a0> (1983).
7. Garcia, L., Welchen, E. & Gonzalez, D. H. Mitochondria and copper homeostasis in plants. *Mitochondrion* **19**(Pt B), 269–274. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2014.02.011> (2014).
8. Kehrer, J. P. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* **149**, 43–50. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(00\)00231-6](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(00)00231-6) (2000).
9. Gill, S. S. & Tuteja, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* **48**, 909–930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016> (2010).
10. Arnesano, F. *et al.* Metallochaperones and metal-transporting ATPases: A comparative analysis of sequences and structures. *Genome Res.* **12**, 255–271. <https://doi.org/10.1101/gr.196802> (2002).
11. Harrison, M. D., Jones, C. E. & Dameron, C. T. Copper chaperones: Function, structure and copper-binding properties. *J. Biol. Inorg. Chem.* **4**, 145–153. <https://doi.org/10.1007/s007750050297> (1999).
12. Palumaa, P. Copper chaperones: The concept of conformational control in the metabolism of copper. *FEBS Lett.* **587**, 1902–1910. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.05.019> (2013).
13. Xiao, Z. *et al.* Unification of the copper(I) binding affinities of the metallo-chaperones Atx1, Atox1, and related proteins: Detection probes and affinity standards. *J. Biol. Chem.* **286**, 11047–11055. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.213074> (2011).
14. Rae, T. D., Schmidt, P. J., Pufahl, R. A., Culotta, V. C. & O'Halloran, T. V. Undetectable intracellular free copper: The requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* **284**, 805–808. <https://doi.org/10.1126/science.284.5415.805> (1999).
15. Pufahl, R. A. *et al.* Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor Atx1. *Science* **278**, 853–856. <https://doi.org/10.1126/science.278.5339.853> (1997).
16. 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.* **45**, 225–236. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2005.02601.x> (2006).
17. Hoppen, C. *et al.* Soluble and membrane-bound protein carrier mediate direct copper transport to the ethylene receptor family. *Sci Rep* **9**, 10715. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47185-6> (2019).
18. Puig, S. *et al.* Higher plants possess two different types of ATX1-like copper chaperones. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **354**, 385–390. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.12.215> (2007).
19. Himelblau, E. *et al.* Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene ATX1 from Arabidopsis. *Plant Physiol.* **117**, 1227–1234. <https://doi.org/10.1104/pp.117.4.1227> (1998).
20. del Pozo, T., Cambiazo, V. & Gonzalez, M. Gene expression profiling analysis of copper homeostasis in Arabidopsis thaliana. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **393**, 248–252. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.01.111> (2010).
21. Shin, L. J., Lo, J. C. & Yeh, K. C. Copper chaperone antioxidant protein1 is essential for copper homeostasis. *Plant Physiol.* **159**, 1099–1110. <https://doi.org/10.1104/pp.112.195974> (2012).
22. Mira, H., Martinez-Garcia, F. & Penarrubia, L. Evidence for the plant-specific intercellular transport of the Arabidopsis copper chaperone CCH. *Plant J.* **25**, 521–528. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.2001.00985.x> (2001).
23. Mira, H., Vilar, M., Perez-Paya, E. & Penarrubia, L. Functional and conformational properties of the exclusive C-domain from the Arabidopsis copper chaperone (CCH). *Biochem. J.* **357**, 545–549. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3570545> (2001).
24. 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.* **4**, 7. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-4-7> (2004).
25. Jumper, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**, 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2> (2021).
26. Varadi, M. *et al.* AlphaFold protein structure database: Massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res.* **50**, D439–D444. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061> (2022).
27. Wernimont, A. K., Huffman, D. L., Lamb, A. L., O'Halloran, T. V. & Rosenzweig, A. C. Structural basis for copper transfer by the metallochaperone for the Menkes/Wilson disease proteins. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 766–771. <https://doi.org/10.1038/78999> (2000).
28. Chai, L. X. *et al.* A putative nuclear copper chaperone promotes plant immunity in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* **71**, 6684–6696. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa401> (2020).
29. Hamza, I., Schaefer, M., Klomp, L. W. & Gitlin, J. D. Interaction of the copper chaperone HAH1 with the Wilson disease protein is essential for copper homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 13363–13368. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.23.13363> (1999).
30. Hoppen, C. & Groth, G. Novel insights into the transfer routes of the essential copper cofactor to the ethylene plant hormone receptor family. *Plant Signal Behav.* **15**, 1716512. <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1716512> (2020).
31. Kihlken, M. A., Leech, A. P. & Le Brun, N. E. Copper-mediated dimerization of CopZ, a predicted copper chaperone from *Bacillus subtilis*. *Biochem. J.* **368**, 729–739. <https://doi.org/10.1042/BJ20021036> (2002).
32. Arnesano, F., Banci, L., Bertini, I., Huffman, D. L. & O'Halloran, T. V. Solution structure of the Cu(I) and apo forms of the yeast metallochaperone, Atx1. *Biochemistry* **40**, 1528–1539. <https://doi.org/10.1021/bi0014711> (2001).
33. Banci, L., Bertini, I., Del Conte, R., Markey, J. & Ruiz-Duenas, F. J. Copper trafficking: The solution structure of *Bacillus subtilis* CopZ. *Biochemistry* **40**, 15660–15668. <https://doi.org/10.1021/bi0112715> (2001).
34. Anastassopoulou, I. *et al.* Solution structure of the apo and copper(I)-loaded human metallochaperone HAH1. *Biochemistry* **43**, 13046–13053. <https://doi.org/10.1021/bi0487591> (2004).
35. Tanchou, V. *et al.* Copper-mediated homo-dimerisation for the HAH1 metallochaperone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **325**, 388–394. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.10.048> (2004).
36. Lowe, J. *et al.* A mutational study in the transmembrane domain of Ccc2p, the yeast Cu(I)-ATPase, shows different roles for each Cys-Pro-Cys cysteine. *J. Biol. Chem.* **279**, 25986–25994. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308736200> (2004).
37. Tsvikovskii, R., Eisses, J. F., Kaplan, J. H. & Lutsenko, S. Functional properties of the copper-transporting ATPase ATP7B (the Wilson's disease protein) expressed in insect cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 976–983. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109368200> (2002).
38. Burkhead, J. L., Gogolin Reynolds, K. A., Abdel-Ghany, S. E., Cohu, C. M. & Pilon, M. Copper homeostasis. *New Phytol.* **182**, 799–816. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02846.x> (2009).
39. Mirdita, M. *et al.* ColabFold: Making protein folding accessible to all. *Nat. Methods* **19**, 679–682. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1> (2022).
40. Altschul, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389> (1997).
41. Altschul, S. F. *et al.* Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS J.* **272**, 5101–5109. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04945.x> (2005).
42. Berman, H. M. *et al.* The protein data bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235> (2000).
43. Klomp, L. W. *et al.* Identification and functional expression of HAH1, a novel human gene involved in copper homeostasis. *J. Biol. Chem.* **272**, 9221–9226. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.14.9221> (1997).
44. Yang, D., Xiao, P., Qiu, B., Yu, H. F. & Teng, C. B. Copper chaperone antioxidant 1: Multiple roles and a potential therapeutic target. *J. Mol. Med.* **101**, 527–542. <https://doi.org/10.1007/s00109-023-02311-w> (2023).
45. Banci, L. *et al.* The Atx1-Ccc2 complex is a metal-mediated protein-protein interaction. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 367–368. <https://doi.org/10.1038/nchembio797> (2006).
46. Mulnaes, D., Koenig, F. & Gohlke, H. TopSuite web server: A meta-suite for deep-learning-based protein structure and quality prediction. *J. Chem. Inf. Model.* **61**, 548–553. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.0c01202> (2021).

47. Mulnaes, D., Golchin, P., Koenig, F. & Gohlke, H. TopDomain: Exhaustive protein domain boundary metaprediction combining multisource information and deep learning. *J. Chem. Theory Comput.* **17**, 4599–4613. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.1c00129> (2021).
48. Mulnaes, D., Schott-Verdugo, S., Koenig, F. & Gohlke, H. TopProperty: Robust metaprediction of transmembrane and globular protein features using deep neural networks. *J. Chem. Theory Comput.* **17**, 7281–7289. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.1c00685> (2021).
49. Jones, D. T. & Cozzetto, D. DISOPRED3: precise disordered region predictions with annotated protein-binding activity. *Bioinformatics* **31**, 857–863. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu744> (2015).
50. Rosenzweig, A. C. *et al.* Crystal structure of the Atx1 metallochaperone protein at 1.02 Å resolution. *Structure* **7**, 605–617. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(99\)80082-3](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(99)80082-3) (1999).
51. Levy, A. R., Turgeman, M., Gevorkyan-Aiapetov, L. & Ruthstein, S. The structural flexibility of the human copper chaperone Atox1: Insights from combined pulsed EPR studies and computations. *Protein Sci.* **26**, 1609–1618. <https://doi.org/10.1002/pro.3197> (2017).
52. Perkal, O. *et al.* Cu(I) controls conformational states in human Atox1 metallochaperone: An EPR and multiscale simulation study. *J. Phys. Chem. B* **124**, 4399–4411. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c01744> (2020).
53. Keller, A. M. *et al.* Dynamic multibody protein interactions suggest versatile pathways for copper trafficking. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 8934–8943. <https://doi.org/10.1021/ja3018835> (2012).
54. Siebenmorgen, T. & Zacharias, M. Computational prediction of protein–protein binding affinities. *WIREs Comput. Mol. Sci.* <https://doi.org/10.1002/wcms.1448> (2019).
55. Gohlke, H., Kiel, C. & Case, D. A. Insights into protein–protein binding by binding free energy calculation and free energy decomposition for the Ras-Raf and Ras-RalGDS complexes. *J. Mol. Biol.* **330**, 891–913. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(03\)00610-7](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00610-7) (2003).
56. Solyom, Z. *et al.* BEST-TROSY experiments for time-efficient sequential resonance assignment of large disordered proteins. *J. Biomol. NMR* **55**, 311–321. <https://doi.org/10.1007/s10858-013-9715-0> (2013).
57. Lescop, E., Rasia, R. & Brutscher, B. Hadamard amino-acid-type edited NMR experiment for fast protein resonance assignment. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 5014–5015. <https://doi.org/10.1021/ja800914h> (2008).
58. Bermel, W. *et al.* Complete assignment of heteronuclear protein resonances by protonless NMR spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **44**, 3089–3092. <https://doi.org/10.1002/anie.200461794> (2005).
59. Delaglio, F. *et al.* NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR* **6**, 277–293. <https://doi.org/10.1007/BF00197809> (1995).
60. Vranken, W. F. *et al.* The CCPN data model for NMR spectroscopy: Development of a software pipeline. *Proteins* **59**, 687–696. <https://doi.org/10.1002/prot.20449> (2005).
61. Schwarzwinger, S. *et al.* Sequence-dependent correction of random coil NMR chemical shifts. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 2970–2978. <https://doi.org/10.1021/ja003760i> (2001).
62. Zhang, H., Neal, S. & Wishart, D. S. RefDB: A database of uniformly referenced protein chemical shifts. *J. Biomol. NMR* **25**, 173–195. <https://doi.org/10.1023/a:1022836027055> (2003).
63. Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M., Clamp, M. & Barton, G. J. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* **25**, 1189–1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033> (2009).
64. Cui, Y. *et al.* OsMSR3, A small heat shock protein, confers enhanced tolerance to copper stress in arabidopsis thaliana. *Int. J. Mol. Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms20236096> (2019).
65. Schrödinger Release 2023-2: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY (2023).
66. Luchko, T. *et al.* Three-dimensional molecular theory of solvation coupled with molecular dynamics in Amber. *J. Chem. Theory Comput.* **6**, 607–624. <https://doi.org/10.1021/ct900460m> (2010).
67. Giambasu, G. M., Case, D. A. & York, D. M. Predicting site-binding modes of ions and water to nucleic acids using molecular solvation theory. *J. Am. Chem. Soc.* **141**, 2435–2445. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b11474> (2019).
68. Mamatkulov, S. & Schwierz, N. Force fields for monovalent and divalent metal cations in TIP3P water based on thermodynamic and kinetic properties. *J. Chem. Phys.* **148**, 074504. <https://doi.org/10.1063/1.5017694> (2018).
69. Li, P., Song, L. F. & Merz, K. M. Jr. Systematic parameterization of monovalent ions employing the nonbonded model. *J. Chem. Theory Comput.* **11**, 1645–1657 (2015).
70. Le Grand, S., Götz, A. W. & Walker, R. C. SPFP: Speed without compromise—A mixed precision model for GPU accelerated molecular dynamics simulations. *Comput. Phys. Commun.* **184**, 374–380 (2013).
71. Stasser, J. P., Siluvai, G. S., Barry, A. N. & Blackburn, N. J. A multinuclear copper(I) cluster forms the dimerization interface in copper-loaded human copper chaperone for superoxide dismutase. *Biochemistry* **46**, 11845–11856. <https://doi.org/10.1021/bi700566h> (2007).
72. Case, D. A. *et al.* The Amber biomolecular simulation programs. *J. Comput. Chem.* **26**, 1668–1688. <https://doi.org/10.1002/jcc.20290> (2005).
73. Maier, J. A. *et al.* ff14SB: Improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB. *J. Chem. Theory Comput.* **11**, 3696–3713. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00255> (2015).
74. Shakeel, S. N., Wang, X., Binder, B. M. & Schaller, G. E. Mechanisms of signal transduction by ethylene: Overlapping and non-overlapping signalling roles in a receptor family. *AoB Plants* <https://doi.org/10.1093/aobpla/plt010> (2013).
75. Hopkins, C. W., Le Grand, S., Walker, R. C. & Roitberg, A. E. Long-time-step molecular dynamics through hydrogen mass repartitioning. *J. Chem. Theory Comput.* **11**, 1864–1874. <https://doi.org/10.1021/ct5010406> (2015).
76. Quigley, D. & Probert, M. Langevin dynamics in constant pressure extended systems. *J. Chem. Phys.* **120**, 11432–11441 (2004).
77. Berendsen, H. J., Postma, J. V., Van Gunsteren, W. F., DiNola, A. & Haak, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* **81**, 3684–3690 (1984).
78. Roe, D. R. & Cheatham, T. E. III. PTRAJ and CPPTRAJ: software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data. *J. Chem. Theory Comput.* **9**, 3084–3095 (2013).
79. Case, D. A. *et al.* AmberTools. *J. Chem. Inf. Model.* <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.3c01153> (2023).
80. Case, D. A. *et al.* Amber 2022, University of California, San Francisco (2022).
81. van der Bondi, A. Waals volumes and radii. *J. Phys. Chem.* **68**, 441–451. <https://doi.org/10.1021/j100785a001> (2002).

Acknowledgements

This work was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) project no. 267205415/CRC 1208 grant to GG (TP B06), HG (TP A03), and DW (TP B02). We are grateful for computational support and infrastructure provided by the “Zentrum für Informations- und Medientechnologie” (ZIM) at the Heinrich Heine University Düsseldorf and the computing time provided by the John von Neumann Institute for Computing (NIC) to HG on the supercomputer JUWELS at Jülich Supercomputing Centre (JSC) (user ID: HKF7, VSK33, ETR1). The authors acknowledge access to the Jülich–Düsseldorf Biomolecular NMR Center that is jointly run by the Forschungszentrum Jülich and Heinrich Heine University Düsseldorf and thank Dr.

Matthias Stoldt and Dr. Nils-Alexander Lakomek for help during NMR spectra acquisition and data analysis. Furthermore, the funding of the Bruker cryo-13C-TXO probe (DFG INST 208/620-1 FUGG) is acknowledged.

Author contributions

G.G. and D.D. conceived the project, D.D., C.H., M.S. and G.G. designed wet-lab experiments, L.S.K., S.S.-V. and H.G. designed computational experiments. D.D., C.H. and M.S. performed wet-lab and NMR experiments, L.S.K. and S.S.-V. performed computational experiments. M.S. and D.W. advised and evaluated NMR experiments. L.S.K. and S.S.-V. analyzed computational results and described and interpreted computational experiments in the “methods” and “results” section. H.G. advised, evaluated, and revised computational results. G.G. and D.D. wrote and structured the manuscript. All authors read and edited the manuscript prior to publication.

Funding

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-024-69532-y>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to G.G.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2024

Supplementary Information

Structure and dimerization properties of the plant-specific copper chaperone CCH

Dominik Dluhosch¹, Lisa Sophie Kersten², Stephan Schott-Verdugo³, Claudia Hoppen¹, Melanie Schwarten⁴, Dieter Willbold^{4,5}, Holger Gohlke^{2,3} and Georg Groth^{1*}

¹Institute of Biochemical Plant Physiology, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany

²Institute for Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, Heinrich-Heine-Universität 40225 Düsseldorf, Düsseldorf, Germany

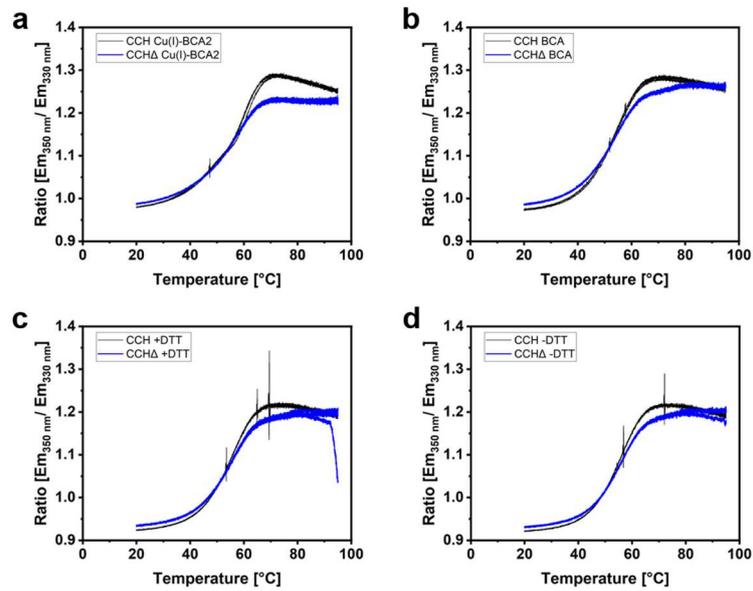
³Institute of Bio- and Geosciences: Bioinformatics (IBG-4), Forschungszentrum Jülich, 52425 Jülich, Germany

⁴Institute of Biological Information Processing: Structural Biochemistry (IBI-7), Forschungszentrum Jülich, 52425 Jülich, Germany

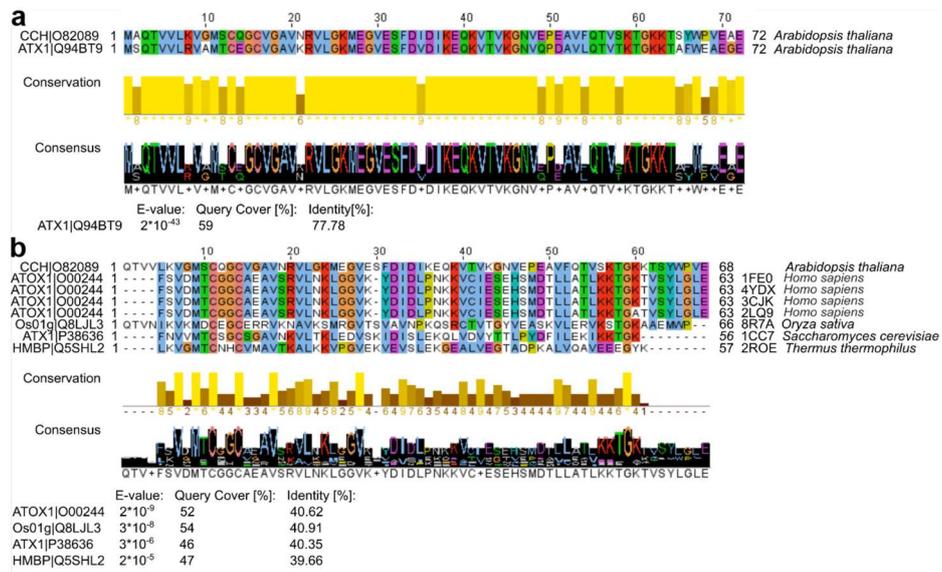
⁵Institut für Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany

*Corresponding author:

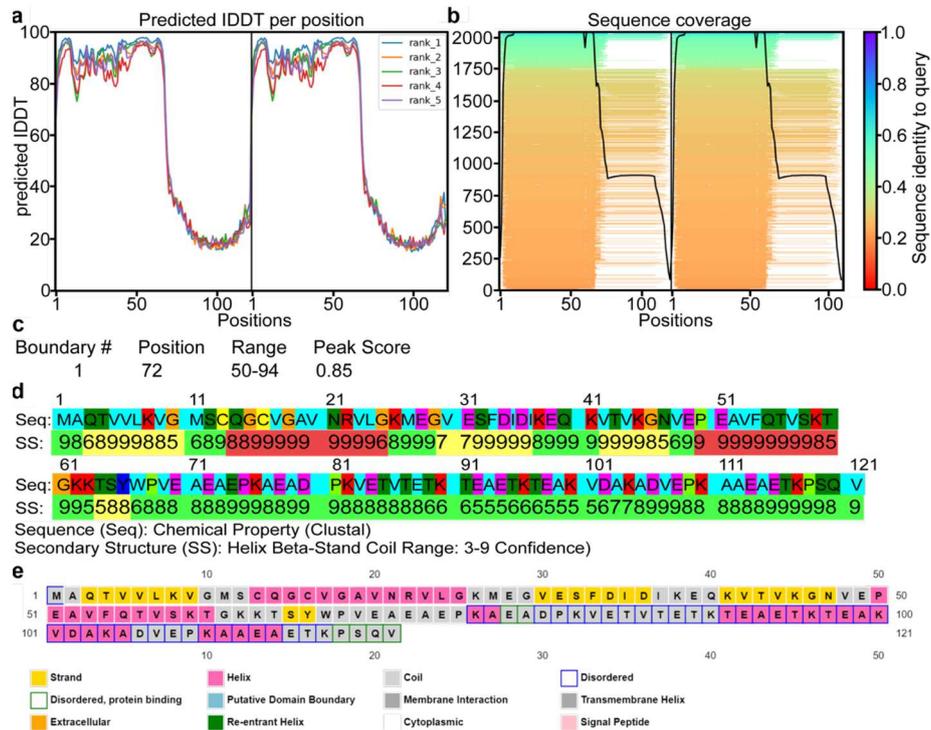
Georg Groth, Biochemical Plant Physiology, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Universitätsstraße 1, 40225 Düsseldorf, Tel. 0049 211 81-12822,
E-mail: georg.groth@hhu.de



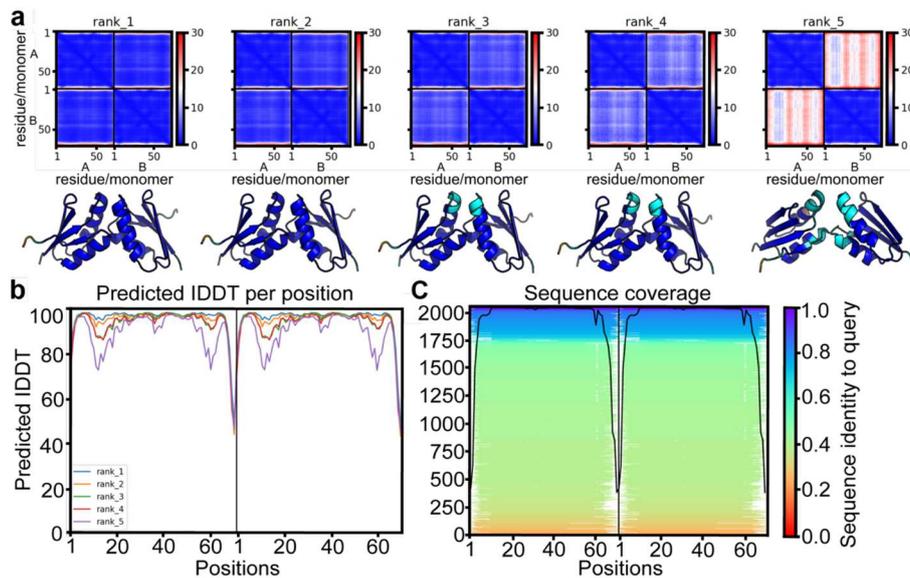
Supplementary Fig. S1. Melting curves of CCH and CCH Δ determined by nanoDSF. The fluorescence emission of CCH and CCH Δ at 350 nm and 330 nm is plotted as the 350 nm/330 nm emission ratio as a function of temperature to monitor temperature dependent protein unfolding. Spectra of CCH (black) and of CCH Δ (blue) in the presence of (a) Cu(I)-(BCA)₂, (b) copper-free BCA, (c) DTT and (d) without DTT. In each figure, spectra of all three technical replicates are shown.



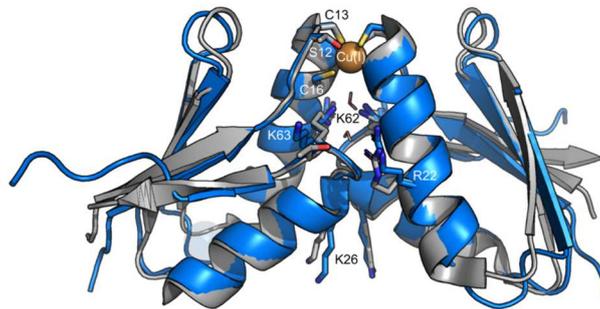
Supplementary Fig. S2. Sequence alignment of CCH to known homologs. Amino acids are colored according to the CLUSTAL color scheme. (a) Alignment of CCH and ATX1 in *A. thaliana*. The alignment has an E-value of 2×10^{-43} , a query coverage of 59 %, and a sequence identity of 78 %. (b) Alignment of CCH to sequences of homologous structures from the PDB database. The E-value, query coverage, and sequence identity range from 2×10^{-9} to 3×10^{-6} , 54 % to 46 %, and 41 % to 39 %, respectively. CCH shares several conserved amino acids, including the characteristic copper-binding motif (MxCxxC) with the homologous structures, confirming CCH as a homolog of ATX1 from *A. thaliana*, yeast, and humans.



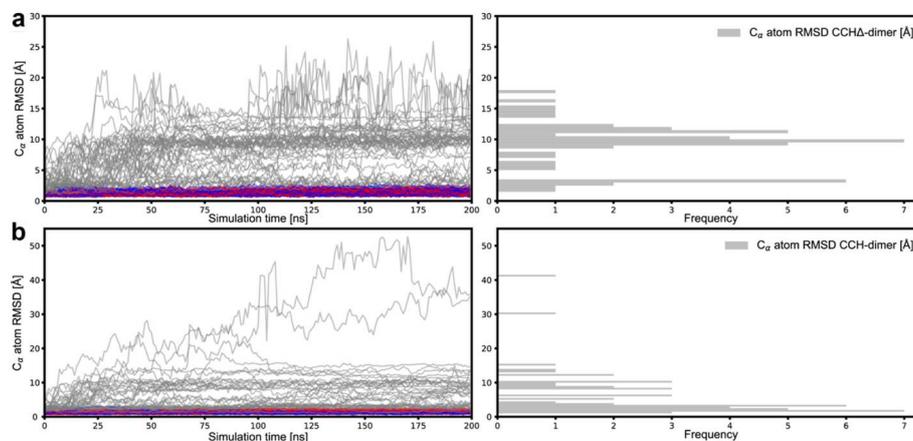
Supplementary Fig. S3. Analysis of CCH dimer prediction. (a) pLDDT (per-residue Local Distance Difference Test) of the CCH-dimer predicted by *ColabFold*. The pLDDT value provides an estimate of a residue's local accuracy of the predicted protein structure on a scale of 0 to 100. A value of 70 to 90 indicates a good model, as is the case for the ATX1-like fold, where there is a generally good prediction of the backbone. Since a pLDDT value below 50 is present for the C-terminal end, this prediction should not be interpreted further. (b) Sequence coverage of the CCH-dimer predicted by *ColabFold*. High sequence coverage indicates that a significant portion of the protein structure has been predicted, leading to a more comprehensive understanding of the three-dimensional arrangement of the protein; this is the case for the ATX1-like fold of CCH. The lower sequence coverage in the C-terminal part of CCH indicates that the structure prediction is less reliable to unavailable. (c) TopDomain prediction of a putative domain boundary at position 72 of the full-length CCH sequence with a peak of 0.8. (d) TopProperty prediction of the CCH structure. Residues 1-66 form the ATX1-like fold. The C-terminus (residues 67-121) is predicted to be an unstructured coil. The sequence is colored according to CLUSTAL colors for chemical properties; the secondary structure (SS) is in red for helices, yellow for β -strands, and green for coil conformation. (e) DISOPRED prediction of the CCH structure. Similar to TopProperty, residues 1-66 form the ATX1-like fold. The C-terminus is predicted to be disordered.



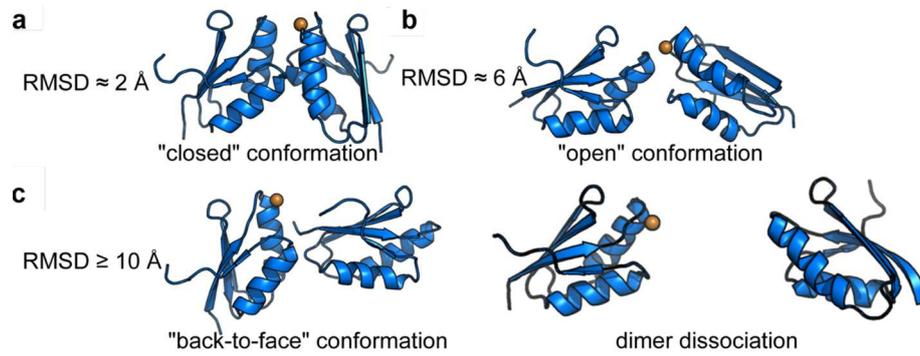
Supplementary Fig. S4. Quality analysis of the CCH Δ dimer model. (a) Predicted alignment error (PAE) matrices of the CCH Δ -dimer models from *ColabFold*. A high PAE (red) indicates a high expected position error for the residue at x, if the predicted and true structure is aligned at residue y. A low PAE (blue) indicates low expected position errors. The vertical and horizontal lines in the PAE matrix separate the corresponding monomers forming the CCH Δ -dimer. Structures of the corresponding ranks are colored according to pLDDT. Regions with pLDDT > 90 are expected to be modeled with high accuracy (dark blue). Regions with pLDDT of 70 to 90 are expected to be modeled well (turquoise). A pLDDT between 50 and 70 indicates low confidence (orange). (b) Display of pLDDT per position and (c) sequence coverage for the CCH Δ -dimer. Residues 1-66 show a low PAE and a high model confidence, indicating an overall good quality of the CCH Δ -dimer.



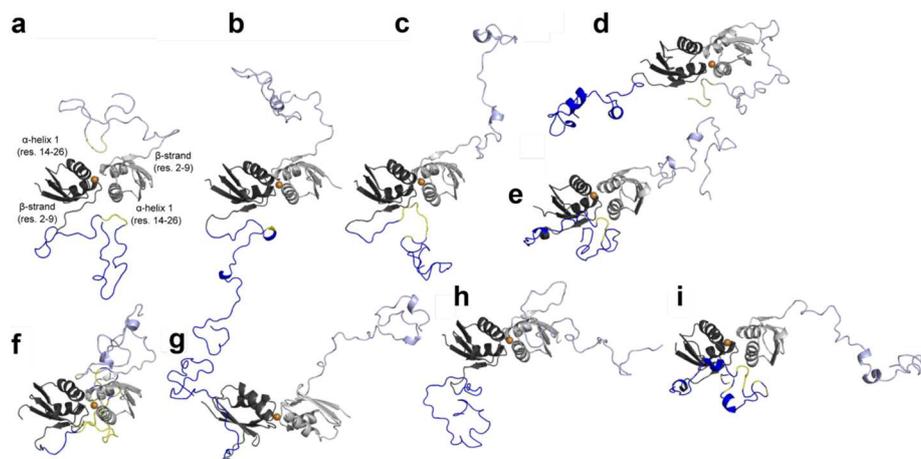
Supplementary Fig. S5. Comparison of the CCH Δ -dimer and a crystal structure of the CCH homologue HAH1 dimer bound to Cu(I). Overlay of the *ColabFold* CCH Δ -dimer model (blue) and the X-ray structure of the CCH homologue HAH1 (PDB ID: **1FEE**, grey). Although both proteins share a sequence identity of 41%, the C α RMSD between the X-ray structure and the CCH Δ -dimer is 0.5 Å. Amino acids forming the copper binding motif and the dimer interface are mostly conserved in both proteins. Furthermore, the orientation of the side chains known to form the dimer interface is broadly consistent between the model and PDB ID: **1FEE**. This is particularly true for the residues near the copper binding site S12, C13, and C16. Minor deviations exist for residues R22, K26, K62, and K63.



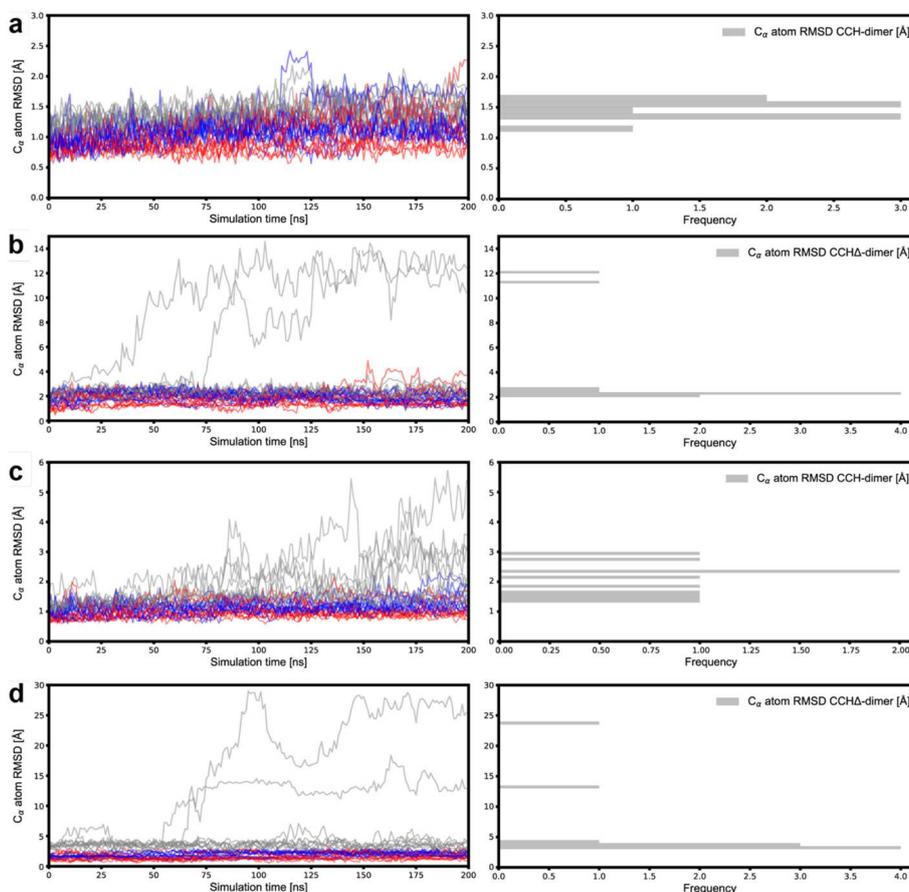
Supplementary Fig. S6. C α atom RMSD of each ATX1-like fold and the dimer overall. (a) Left: C α atom RMSD of each ATX1-like fold (red and blue) and the CCH Δ -dimer (grey) of all 50 replicas. Right: Distribution of the corresponding mean C α atom RMSD values from nanosecond 101 to 200 of the CCH Δ -dimer. (b) Left: C α atom RMSD of each ATX1-like fold (red and blue) and the CCH-dimer (grey) of all 50 replicas. Right: Distribution of the corresponding mean C α atom RMSD values from nanosecond 101 to 200 of the CCH-dimer.



Supplementary Fig. S7. Different states of CCH-dimers that occur in CCH- and CCH Δ -dimer trajectories. (a) Representative of a CCH-dimer structure for replicas showing a C α RMSD of approximately 2 Å. This structure is comparable to the “closed” conformation of the homolog ATOX1. (b) Representative of a CCH-dimer structure of replicas showing a C α RMSD of approximately 6 Å. This structure is comparable to the “open” conformation of the homolog ATOX1. (c) Representation of CCH-dimer structures of replicas showing a C α RMSD of ≥ 10 Å. The structures are similar to the “back-to-face” conformation of the homolog ATOX1 or show dimer dissociation.



Supplementary Fig. S8. Molecular dynamics simulations of CCH with emphasize on the structural arrangement of the C-terminal extension. Representative structures of spatial arrangements of the C-termini (dark and light blue) in copper-loaded CCH-dimers (ATX1-like folds in dark and light grey). No interaction of the C-terminal ends with each other was observed. Either the C-termini are exposed to the solvent (panels b, g, h) or located close to the monomer at the same side as the first β -strand (see labels) of the ATX1-like fold. Yellow colored residues show less than 5 Å distance to the first α -helix (residues 14-26) of the other monomer (panels a, c, d, e, f, i).



Supplementary Fig. S9. C α atom RMSD of each ATX1-like fold and the dimer overall after restart. (a) Restarting the final frame in replica 43 results in 10 out of 10 replicas with an overall RMSD < 4 Å. Left: C α atom RMSD of each ATX1-like fold (red and blue) and the CCH-dimer (grey) of all 10 replicas. Right: Distribution of the corresponding mean C α atom RMSD values from nanosecond 101 to 200 of the CCH-dimer. (b) Restarting the final frame in replica 49 results in 8 out of 10 replicas with an overall RMSD < 4 Å. Left: C α atom RMSD of each ATX1-like fold (red and blue) and the CCH Δ -dimer (grey) of all 10 replicas. Right: Distribution of the corresponding mean C α atom RMSD values from nanosecond 101 to 200 of the CCH Δ -dimer. (c) Restarting the final frame in replica 43 results in 6 out of 10 replicas with an overall RMSD < 4 Å. Left: C α atom RMSD of each ATX1-like fold (red and blue) and the CCH Δ -dimer (grey) of all 10 replicas. Right: Distribution of the corresponding mean C α atom RMSD values from nanosecond 101 to 200 of the CCH-dimer. (d) Restarting the final frame in replica 49 results in 8 out of 10 replicas with an overall RMSD < 4 Å. Left: C α atom RMSD of each ATX1-like fold (red and blue) and the CCH Δ -dimer (grey) of all 50 replicas. Right: Distribution of the corresponding mean C α atom RMSD values from nanosecond 101 to 200 of the CCH Δ -dimer.

3.2 Molekularer Mechanismus und strukturelle Modelle des Protein-vermittelten Kupfertransfers zum *Arabidopsis thaliana* Ethylenrezeptor ETR1 an der ER-Membran

- Titel:** Molecular Mechanism and Structural Models of Protein-Mediated Copper Transfer to the *Arabidopsis thaliana* Ethylene Receptor ETR1 at the ER Membrane
- Autoren:** **Dominik Dluhosch**, Lisa Sophie Kersten, Alexander Minges, Stephan Schott-Verdugo, Holger Gohlke und Georg Groth
- Publiziert in:** Wird eingereicht (Manuskript hinterlegt auf bioRxiv)
- DOI:** 10.1101/2025.01.21.634023
- Eigener Anteil** Planung, Design und Durchführung sowie Auswertung von Experimenten, davon:
- Klonierung, Expression und Reinigung der MBDs
 - MST- und Cu(I)-Bindungsexperimente, CD-Spektroskopie
 - Screening von Kristallisationsbedingungen
 - Erstellen von Abbildungen
 - Verfassen und Strukturieren des Manuskripts

Molecular Mechanism and Structural Models of Protein-Mediated Copper Transfer to the *Arabidopsis thaliana* Ethylene Receptor ETR1 at the ER Membrane

Dominik Dluhosch^{1,4}, Lisa Sophie Kersten^{2,4}, Alexander Minges¹, Stephan Schott-Verdugo³, Holger Gohlke^{2,3,5} und Georg Groth^{1,5,*}

Affiliations

1 Institute of Biochemical Plant Physiology, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany.

2 Institute for Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany.

3 Institute of Bio- and Geosciences (IBG-4: Bioinformatics), Forschungszentrum Jülich, 52425 Jülich, Germany.

4 Share first authorship

5 Share senior authorship

* Correspondence: Georg Groth (georg.groth@hhu.de)

Running title

Mechanism & Models for the Copper Transfer to ETR1

Abstract

In plants, the gaseous plant hormone ethylene regulates a wide range of developmental processes and stress responses. The small unsaturated hydrocarbon is detected by a family of receptors (ETRs) located in the membrane of the endoplasmic reticulum, which rely on a monovalent copper cofactor to detect this hydrocarbon. The copper-transporting P-type ATPase RAN1 (HMA7), located in the same membrane, is known to be essential for the biogenesis of ETRs. Still, the precise molecular mechanism by which the receptors acquire their copper cofactor remains unclear. A recent study by our laboratory demonstrated a direct interaction between RAN1 and soluble copper chaperones of the ATX1 family with the model ethylene receptor ETR1, providing initial insights into the mechanism by which copper is transferred from the cytosol to the membrane-bound receptors. In this study, we further investigated these interactions with respect to the function of individual domains in complex formation. To this end, we combined biochemical experiments and computational predictions and unraveled the processes and mechanisms by which copper is transferred to ETR1 at the molecular level.

Key words: ETR1, RAN1, copper transfer, protein-protein interaction, protein complex prediction

Introduction

Ethylene is a gaseous plant hormone that plays a crucial role in a number of developmental and environmental processes in plants, including stress response, senescence, and fruit ripening. In *Arabidopsis thaliana*, the ethylene molecule is perceived by a family of membrane-bound receptor proteins (ETR1, ERS1, ETR2, EIN4, and ERS2) located at the ER membrane (Chen *et al.*, 2002). All of them require an essential copper cofactor bound at their transmembrane sensor domain to sense the plant hormone with high affinity, specificity, and functionality (Rodriguez *et al.*, 1999; Schaller *et al.*, 1995).

The transition metal copper is an essential micronutrient for a wide range of organisms, including plants. This is largely because copper can adopt different oxidation states *in vivo*. However, this redox property contributes to its intrinsic toxicity (Festa and Thiele, 2011; Kumar *et al.*, 2021; Mir *et al.*, 2021; Shabbir *et al.*, 2020). Redox cycling between Cu(II) and Cu(I) leads to the formation of so-called reactive oxygen species (ROS) (Kehrer, 2000), which further damage lipids, DNA, proteins, and other biomolecules (Brewer, 2010; Gill and Tuteja, 2010). Therefore, safe transportation within cells by specialized proteins is essential to ensure correct cellular functions and restrict damage induced by ROS.

In plants, several proteins have been identified that are responsible for the safe transport and modulation of intracellular copper levels. These include copper transporting transmembrane P_{1B}-type heavy metal ATPases (HMAs) (Arnesano *et al.*, 2002; Harrison *et al.*, 1999; Harrison *et al.*, 2000) and the cytosolic Cu(I)-complexing chaperones of the ATX1 family. In contrast to the cytosolic chaperones ATX1 (Andres-Colas *et al.*, 2006) and CCH (Himmelblau *et al.*, 1998; Puig *et al.*, 2007), the ER-bound transmembrane copper-transporting ATPase RAN1 has two metal binding domains (MBDs) at its N-terminus (Hirayama *et al.*, 1999; Pirrung *et al.*, 2008), which is distinct from the single MBD observed in the ATX1 family. Still, the precise mechanism by which copper is transported from the different plant copper chaperones to the ethylene receptors and inserted into their transmembrane domains remains largely unknown.

Our laboratory has recently uncovered a direct interaction between the transmembrane domain of *Arabidopsis* ethylene receptor ETR1 and RAN1. Furthermore, these studies provided detailed insights into the role of the soluble copper chaperones ATX1 and CCH in the intracellular transport of Cu(I) and its delivery to the receptor (Hoppen *et al.*, 2019). Previous studies of HMAs and ATX1 homologs provide further insights into the copper transfer from the cytosol to the ER membrane (Andres-Colas *et al.*, 2006; Hamza *et al.*, 1999; Hoppen *et al.*, 2019; Puig *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2018).

To gain further insights into the molecular mechanism underlying ethylene receptor metalation, we adopted an integrated biochemical and computational approach. This allowed us to initially

delineate the individual metal binding domains (MBDs) of RAN1 through computational analyses. The results were subsequently employed in biochemical, biophysical, and structural studies. To pinpoint the individual contribution of each MBD for ETR1-RAN1 complex formation, a truncated version of the receptor was employed in *in vitro* studies. This construct consisted of ETR1 domains that could only be accessed by membrane-bound RAN1, specifically the receptor's copper-binding transmembrane and juxta-membrane GAF domains. In order to gain additional information and derive a detailed mechanism for how copper is transported from the cytosol to the ETR1 transmembrane domain, we also studied the interaction of isolated MBDs with copper chaperones ATX1 and CCH.

Results

Structural models and domain organization of Copper Chaperones ATX1, CCH, and RAN1

The *Arabidopsis* copper transport protein ATX1 is known to adopt a ferredoxin-like fold ($\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ -fold), a conserved structural motif observed in numerous copper-transporting proteins, including its human homolog Atox1 (Rosenzweig *et al.*, 1999b). In order to emphasize the structural similarity of the selected proteins and protein domains to the ATX1 copper chaperone, we refer to this motif as the ATX1-like fold in the following. In accordance with the above, AlphaFold2 (Jumper *et al.*, 2021) also predicts for ATX1 a fold consisting of the typical $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ -fold and the “MxCxxC” copper-binding motif (CBM) (Rosenzweig *et al.*, 1999a) (Figure S1A) (identifier: ATX1: Q94BT9) (Rosenzweig *et al.*, 1999b). Similarly, CCH is known to be a homolog of ATX1 (Puig *et al.*, 2007). It features the ATX1-like fold in its N-terminal metal binding domain (MBD) as well as a characteristic, extended C-terminal domain (Himmelblau *et al.*, 1998; Mira *et al.*, 2001), as predicted by AlphaFold2 (Jumper *et al.*, 2021) (identifier: CCH: O82089). A domain boundary was identified at position 72 between the MBD and the C-terminal end of CCH by the machine learning-based domain boundary prediction method TopDomain (Mulnaes *et al.*, 2021b). This boundary aligns with the drop of pLDDT at position 67 in the AlphaFold model (Figure S1B) (Dluhosch *et al.*, 2024; Jumper *et al.*, 2021).

In contrast to soluble copper chaperones, the ER membrane-bound copper-transporting ATPase RAN1 was predicted to contain two amino-terminal metal-binding motifs, eight membrane-spanning helices, a phosphatase domain, a transduction domain, a phosphorylation domain, and an ATP-binding domain, based on the sequence similarity of RAN1 to homologous P-type copper-transporting ATPases (Hirayama *et al.*, 1999) using sequence-based domain identification. This overall prediction is also reflected in the annotations in the UniProt database entry for RAN1 (identifier: RAN1: Q9S7J8). However, in contrast to the sequence-based domain identification, three domains are reported, with the last one annotated as degenerate. The AlphaFold2 model also predicts three domains at the N-terminal end, all with ATX1-like folds (henceforth referred to as MBDs) and a C_{α} atom RMSD $< 1 \text{ \AA}$ with respect to each other (Figure S1C). However, the third domain (MBD3), which is the most distant from the N-terminus and the closest to the transmembrane domain, lacks the typical CBM (Figure 1A). This domain is missing in the sequence-based identification, probably due to the lack of the canonical CBM in this region. Note that a prediction with TopDomain (Mulnaes *et al.*, 2021b) also identified three MBDs (Figure S1C). In both MBD1 and MBD2, the CBM is located between the first α -helix and β -sheet of the ATX1-like fold. Additionally, unstructured regions are present at the N-terminus before MBD1 and in the linkers between the MBDs, allowing spatial flexibility of the individual domains. This is particularly relevant for

MBD1, which is located most distant from the remaining RAN1 domains (Figure S1C). The boundaries predicted by TopDomain align with the observed drop in the pLDDT of the AlphaFold2 model as previously found for CCH (Figure S1C). Based on these predictions, the MBDs of the plant copper chaperons were assigned as follows: RAN1 (MBD1: AA 55-130, MBD2: AA 132-207, MBD3: AA 205-283), CCH (CCH Δ : AA 1-76, AA 77-121 were omitted) and ATX1 (ATX1: AA 1-76) (Figure S1). Assuming that copper transfer to ETR1 is achieved by direct physical interaction between the CBM of the MBDs, as proposed in a previous study (Hoppen *et al.*, 2019), the individual structures of copper chaperones and MBDs were used to predict chaperone-ETR1 and chaperone-chaperone interactions, in order to elucidate copper transfer to and metalation of ETR receptors.

Crystal structure of the degenerate metal binding domain MBD3

To corroborate the AlphaFold2 (Jumper *et al.*, 2021; Varadi *et al.*, 2022) prediction of a third ATX1-like fold domain at the N-terminus of RAN1, we expressed, purified, and analyzed this predicted domain by X-ray crystallography (Figure 1B, C). The obtained crystal of the RAN1 MBD3 from *Arabidopsis thaliana* belongs to the orthorhombic space group P2₁22₁ with unit cell constants $a = 50.755 \text{ \AA}$, $b = 51.481 \text{ \AA}$, $c = 62.722 \text{ \AA}$. The crystal structure was determined by molecular replacement (MR) using the AlphaFold2 (Jumper *et al.*, 2021; Varadi *et al.*, 2022) prediction of RAN1 (AlphaFold DB: Q9S7J8) cut to the sequence of MBD3 as a template. The structure was refined to a resolution of 1.98 \AA with $R_{\text{free}} = 23.5\%$ and $R_{\text{work}} = 19.2\%$, and MBD3 of RAN1 was modeled to completeness. Crystallographic data are summarized in Table S1. Compared to the primary sequence of the used construct, only the N-terminal part of the structure, consisting of the affinity-tag and a flexible linker, is absent from the deposited structure (PDB-ID: 8RNZ). Despite some inconclusive electron density in these regions, the protein backbone could not be successfully traced, probably due to the high flexibility of these regions.

The asymmetric unit comprises two molecules with an overall structural similarity (mutual RMSD = 0.355 \AA ; RMSDs to the AlphaFold2 model = 0.501/0.641 \AA). Both molecules display the ATX1-like fold, which is typically found in copper chaperones and the regulatory domains of P_{1B}-Tpye ATPases (Anastassopoulou *et al.*, 2004; Banci *et al.*, 2001; Gitschier *et al.*, 1998; Rosenzweig *et al.*, 1999a; Wernimont *et al.*, 2000) confirming the AlphaFold2 structure prediction. The final structure of MBD3 is shown in Figure 1C. As previously stated, the CBM is absent. The cysteines have been substituted with asparagine and aspartate, in accordance with the results of sequence analysis by a multiple sequence alignment using Clustal Omega (Madeira *et al.*, 2022) (Figure 1A). Accordingly, MBD3 is considered degenerate as classified

in the UniProt database (Consortium, 2021) (UniProt-ID: Q9S7J8). Noteworthy, a structurally related SxxS (SSRS) sequence motif is present in a loop region and α -helix 2 close to the C-terminus on the opposite side of the protein (Figure 1D). Previous studies have reported that such an SxxS motif is capable of binding Cu(I)-ions (Pavlin *et al.*, 2019; Stasser *et al.*, 2005).

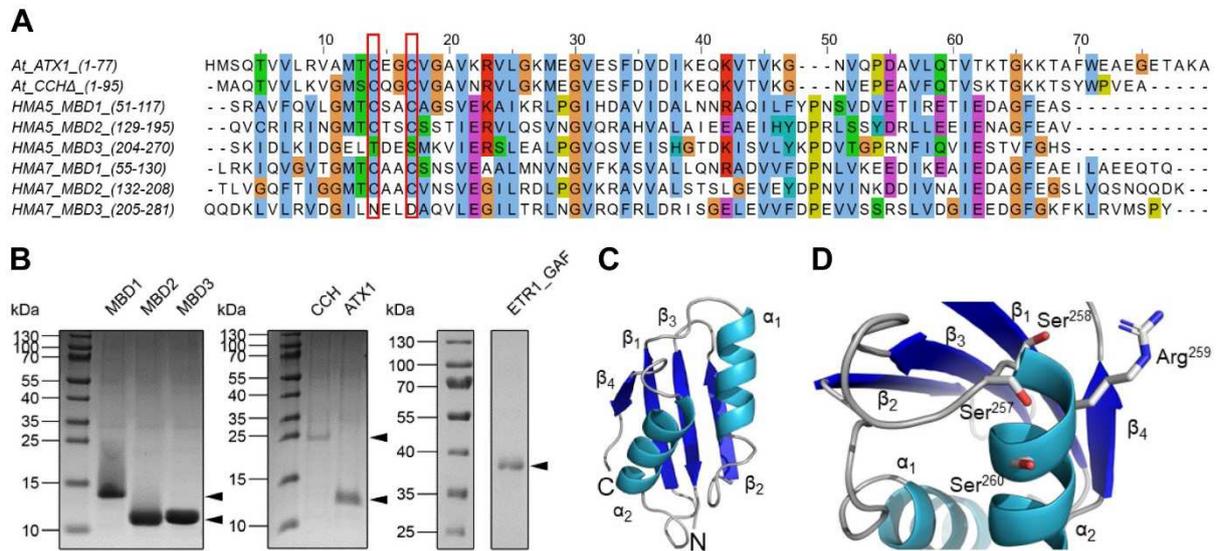


Figure 1: Characteristics and purity of copper chaperones, metal binding domains, and ETR1 protein constructs. **A:** Multiple sequence alignment of ATX1, the N-terminal metal binding domains (MBD) of CCH (CCH Δ), and MBDs of HMA5 and HMA7 (RAN1) from *Arabidopsis thaliana*. Amino acids are colored according to the Clustal X color scheme. Cysteines forming the copper binding motif (CBM) in ATX1, CCH Δ , and in MBD1-2 in HMA5 and HMA7 are highlighted by a red box. Note that these cysteines are missing in MBD3 of HMA5 and HMA7. The amino acids of the individual domains, which refer to their positions in the corresponding full-length proteins (given in brackets), represent the sequences of heterologously expressed and purified proteins used in this study. **B:** SDS-PAGE of all proteins used for *in vitro* experiments in this study. MBD1-3 refer to the MBDs of HMA7 as shown in (A). A truncation mutant of ETR1 containing the transmembrane- and GAF-domains (ETR1_GAF, aa 1-316) was used for subsequent interaction studies. **C:** Crystal structure of the RAN1 MBD3 from *Arabidopsis thaliana* at a resolution of 1.98 Å (PDB ID 8RNZ). **D:** Structure of the C-terminal region of the RAN1 MBD3 containing the SSRS sequence motif. Amino acid sidechains of this sequence motif are shown as sticks.

Structural and functional integrity of purified proteins

Following the expression and purification of the various individual RAN1 MBDs, their biochemical and structural characteristics were evaluated to confirm that they were properly folded and functional, which was essential for subsequent interaction studies with the purified ethylene receptor ETR1. The successful purification of all proteins used in this study was demonstrated by SDS-PAGE (Figure 1B), and protein identity was confirmed by western blotting and immunodetection of the affinity tag (not shown).

First, the structural integrity of the purified MBDs was analyzed by CD-spectroscopy. Subsequently, their copper binding abilities were probed to further confirm protein function. CD-spectra of α -helical proteins are characterized by three distinctive extrema, with a maximum at 193 nm and two minima at about 208 nm and 222 nm (Holzwarth and Doty, 1965), while proteins that mainly consist of β -sheets display a maximum at 195 nm and a minimum at about 218 nm (Greenfield and Fasman, 1969). In contrast, disordered proteins are characterized by a minimum at 195 nm and overall minimal residual ellipticity above 210 nm (Venyaminov *et al.*, 1993). The CD spectra of MBD1 and MBD3 display positive maxima at approximately 195 nm and two negative minima at approximately 208 nm and 222 nm, indicating the presence of α -helices in these MBDs. MBD2 displays the same characteristics, with a negative residual ellipticity minimum at about 222 nm, which is shifted towards 218 nm, and a positive maximum, which is shifted towards 193 nm. These differences are indicative of a higher proportion of β -sheets in MBD2 compared to MBD1 and MBD3 (Figure 2A). Overall, these data indicate the presence of secondary structure and suggest the structural integrity of the purified recombinant MBDs. Quantitative analysis by the BeStSel webserver (Micsonai *et al.*, 2022; Micsonai *et al.*, 2018; Micsonai *et al.*, 2015) confirms the presence of secondary structure and overall structural similarity of the three RAN1 MBDs, while also indicating some minor differences in the secondary structure, particularly in the α -helix and β -sheet regions (Table S2). Note that estimates of the secondary structure composition from CD spectra may fail to provide acceptable results on α/β -mixed or β structure-rich proteins; the BeStSel method used here has been developed to mitigate such challenges (Micsonai *et al.*, 2015).

Following CD-spectroscopy, we studied copper binding to the purified MBDs to further probe their structural integrity and function. To this end, a spectrophotometric assay was employed, in which the high-affinity Cu(I)-specific ligand bicinehoninic acid (BCA) competes for copper binding with other Cu(I) chelators (Dluhosch *et al.*, 2024; Schott-Verdugo *et al.*, 2019). In this assay, the formation of the chromophoric Cu(I)-BCA₂ complex is reduced accordingly in the presence of copper binding proteins and indicated by a decrease in absorption. The results of this assay (Figure 2B) confirm copper binding to MBD1 and MBD2. MBD1 showed a higher efficiency to compete with BCA for copper than MBD2, as evidenced by the related EC₅₀ values (EC_{50 MBD1} = 4.3 ± 0.4 μ M and EC_{50 MBD2} = 8.0 ± 1.5 μ M). Notably, MBD3 also showed copper-binding, with an EC_{50 MBD3} = 9.7 ± 1.1 μ M (Figure 2B). The apparent dissociation constants K_D MBD-Cu(I) were computed according to (eq. 9): MBD1: 4.78 × 10⁻¹⁴ M; MBD2: 8.89 × 10⁻¹⁴ M; MBD3: 1.07 × 10⁻¹³ M. To eliminate the possibility that the copper binding observed with MBD3 is related to incomplete removal and carry-over of the copper chelator DTT from protein purification, buffer controls were treated the same way as MBD3 samples. However, no decrease in absorption and thereby no evidence of copper binding was observed in these samples (Figure 2C), indicating successful buffer exchange after purification prior to copper

binding studies. Moreover, DTT has distinct copper binding characteristics and parameters compared to those observed in the MBD binding studies. This is evidenced by the Hill coefficient of the related binding curves (4.2 for DTT vs 1.4 for MBDs). This further substantiates that the copper binding observed with MBD3 is not caused by DTT. Further tests using a His-tag control protein (MSP1E3) indicate some extent of copper binding by the tag at high protein concentration (Figure 2C). However, in comparison to the MBDs, the observed decrease in absorption is less pronounced, and the overall curve shape does not align with the binding characteristics and parameters observed with the MBDs. Therefore, the copper binding observed with purified MBD3 cannot or at least not entirely be attributed to the His-tag, but reflects binding at MBD3.

Interaction of soluble MBDs with ETR1

Previously published results demonstrated a direct interaction between the ETR1 transmembrane domain (ETR1_TMD) and the copper transporter RAN1 (Hoppen *et al.*, 2019). Further analysis of this interaction using RAN1 subdomains revealed that the N-terminal domain containing the MBDs (NterRAN1) is directly involved in the interaction with ETR1_TMD (Hoppen *et al.*, 2019). However, the localization of three MBDs in NterRAN1, of which MBD3 does not contain the typical CxxC binding motif, raises the question of whether all MBDs bind to ETR1 with similar affinities or if there is a preferred interaction. This, in turn, could provide novel information regarding the sequence and precise mechanism by which copper is transferred from RAN1 to ETR1. To gain detailed insight into the role of each MBD for copper transfer to the receptor in the extra-, juxta-, and intramembrane domain, we applied a receptor construct containing the TMD and the adjacent extramembrane GAF domain (ETR1_GAF) and studied the interactions between individual MBDs and this ETR1 construct. First, we performed *in vitro* interaction studies using microscale thermophoresis (MST) on ETR1_GAF and MBDs in accordance with the experiments outlined in (Hoppen *et al.*, 2019). The results show that MBD1 and MBD2 bind to ETR1_GAF, with overall very similar and almost identical binding curves and apparent dissociation constants (K_D) of $13.3 \pm 4.4 \mu\text{M}$ for MBD1 and $22.3 \pm 12.1 \mu\text{M}$ for MBD2 (Figure 2D). The situation is less clear for the interaction of the ETR1_GAF module and the degenerate metal binding domain MBD3, which shows a less pronounced signal amplitude than observed with MBD1-2 (Figure 2D). Fitting of these data to a single-site binding model, as for MBD1-2, results in an apparent K_D of $6.0 \pm 7.3 \mu\text{M}$ for MBD3. Overall, the binding studies on the individual MBDs suggest that all MBDs bind to the ETR1-GAF receptor construct with similar affinities.

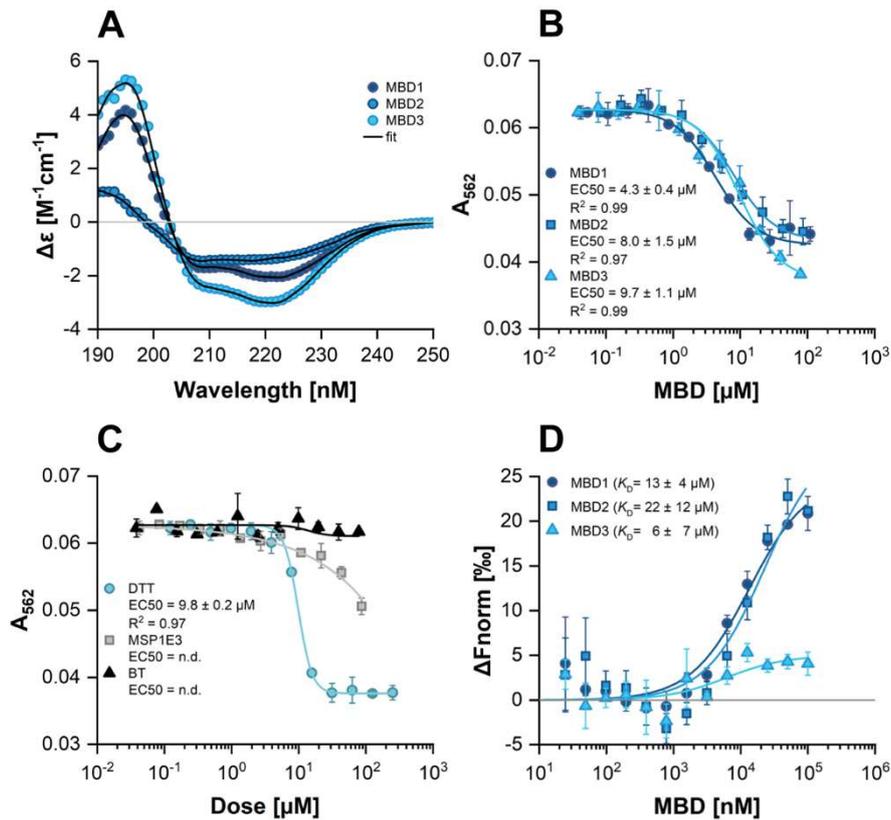


Figure 2: Biophysical and biochemical characterization of the RAN1 metal binding domains (MBDs) 1-3 from *Arabidopsis thaliana*. **A:** Far-UV CD-spectra of MBDs 1 to 3. **B:** Copper transfer from the chromophoric Cu(I)-BCA₂ complex to MBDs 1 to 3 as a function of protein concentration. Competition for copper is monitored at 562 nm. **C:** Control samples used in the copper binding assay. DTT (positive control), MSP1E3 (His-tag control), and bleed-through (BT) control testing for unremoved DTT in MBD samples. Data from **B** and **C** were fit to a four-parameter logistic function and EC50-values are reported in the figure. **D:** Interaction of RAN1 MBDs 1 to 3 with ETR1_GAF¹⁻³¹⁶- studied by microscale thermophoresis (MST). ETR1_GAF¹⁻³¹⁶ is the labeled protein. Data were fit to a one-site binding model and the obtained dissociation constants (K_D) are reported in the figure. In all subfigures, symbols represent experimental data and solid lines represent fitted data. All measurements were performed at least in triplicate.

Structural models of chaperone-ETR1 interactions

We used ColabFold 1.5.2 to generate structural models of the chaperone/MBD-ETR1 interactions (Mirdita *et al.*, 2021). However, models obtained by this approach did not agree with experimental evidence (Hoppen *et al.*, 2019) as either no interaction or only interactions with the TMD of ETR1 were predicted. Such interactions are not plausible as neither the soluble chaperones ATX1 and CCH nor the MBDs of RAN1 contain amino acids that would allow penetration of the ER membrane to reach the copper binding active site located at the middle of the bilayer. Therefore, possible interaction sites between the soluble chaperones ATX1, CCH Δ , and MBD1-3 with ETR1 were first identified using GLINTER (Graph Learning of INTER-protein contacts) (Xie and Xu, 2022). GLINTER is a deep learning method for interfacial

contact predictions of dimers and is based on coevolutionary data obtained by multiple sequence alignments and structural data and can predict possible interaction sites in protein-protein complexes (Xie and Xu, 2022). The predictions obtained using this approach suggest that ATX1 and CCH Δ interact via their copper binding motif (CBM) with the GAF-domain of ETR1 (Figure 3). The construct ETR1³⁰⁶⁻⁷³⁸ used in ref. (Hoppen *et al.*, 2019) lacks the GAF-domain and does not show binding of ATX1 and CCH Δ . An additional contact site is proposed for residues at the beginning of the second β -sheet of the chaperones with the ETR1 linker region connecting the transmembrane domain to the GAF-domain and with the GAF-domain itself. MBD1 and MBD2 of RAN1, like ATX1 and CCH, show interactions around their CBMs with the GAF-domain of ETR1 and interactions with the ETR1 linker region but lack contacts between their second β -sheets and the corresponding ETR1 counterparts. MBD3 is predicted to bind with the second β -sheet to the ETR1 linker region and the GAF domain, similar to ATX1 and CCH. Additional interactions of the degenerative CBM with the ETR1 linker region and GAF domain are indicated. No interaction at the alternative CBM is suggested. Interestingly, out of all tested chaperone-like domains, the predicted interactions for MBD3 with ETR1 are most confident (Figure 3), suggesting a particularly conserved interaction of MBD3 with ETR1. Note that no interactions between ETR1 and the MBDs 1 to 2 at the β -sheet were predicted, contrary to the prediction for ATX1 and CCH. In turn, MBD3 shows the most conserved interactions via the β -sheet (Figure 3).

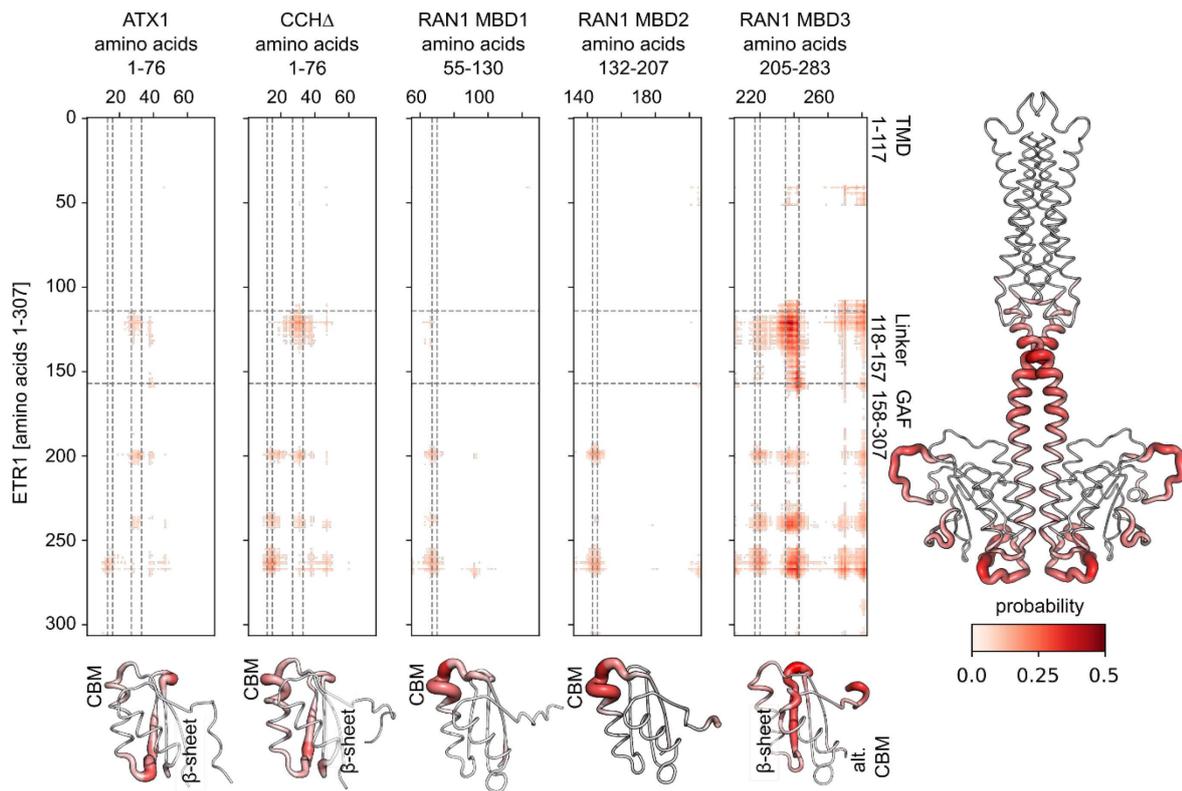


Figure 3: Contact maps of soluble chaperones ATX1, CCH Δ , and MBD1-3 of RAN1 with ETR1 predicted with GLINTER. The darker red color and thicker lines in the putty representation of ETR1_GAF indicate a higher probability of interactions with the chaperones or MBDs. ATX1 and CCH Δ , as well as MBD1 and MBD2 of RAN1, show interactions at the CBM (vertical lines at residues 13 and 16, 67 and 70, 144 and 147, respectively) with the linker region and GAF-domain of ETR1. Additionally, interactions are proposed for the residues at the beginning of the second β -sheet (vertical lines at residues 27 and 33, 235 and 243, respectively) with the ETR1 linker region and GAF domain. The latter interactions are not present for MBD1 and MBD2. For MBD3, no interaction at the degenerate CBM is indicated. Overall, MBD3 displays a similar pattern to ATX1 and CCH, but with higher prediction confidence, showing interactions of the second β -sheet with the ETR1 linker region and GAF domain.

The predicted protein-protein contacts were further used as ambiguous restraints for protein-protein docking using HADDOCK2.4 (Dominguez *et al.*, 2003). For both the full-length *ab initio* (Schott-Verdugo *et al.*, 2019) (Figure 4A-E) and the AlphaFold2 ETR1-model (Figure 4F-J), the density representations of all chaperone poses around ETR1 were investigated and agreed with the defined restraints. The best-scored structures show that ATX1, CCH, and MBD3 interact with the ETR1 GAF domain (Figure 4A, B, E, F, G, J), whereas MBD1 interacts with both the linker region of ETR1 and parts of the GAF-domain (Figure 4C, H). MBD2 interacts with the linker region of ETR1 only (Figure 4D, I). The proposed interaction of MBD2 with the receiver domain of ETR1 (Figure 4D, I) is not meaningful in the biological context, given that the RAN1 copper transporter is located in the same membrane as the ETR1 receptor protein.

In contrast to isolated MBD2 used in our prediction, MBD2 in RAN1 is too distant to access the C-terminal receiver domain of ETR1.

As anticipated from the contact maps used for the restraints in protein-protein docking (Figure 4), the predicted complexes of ATX1 and CCH demonstrate that the CBM is not oriented towards the TMD of ETR1. In contrast, this was observed for MBD1 and MBD2. The CBM is frequently located in close proximity to ETR1 ($< 5 \text{ \AA}$) and to residues able to interact with monovalent copper ions, such as cysteine, histidine, methionine, and serine (Rubino and Franz, 2012; Stasser *et al.*, 2005). This would facilitate direct copper transfer from MBD1 and MBD2 to ETR1. In the case of MBD3, no clear orientation of the degenerate CBM could be determined.

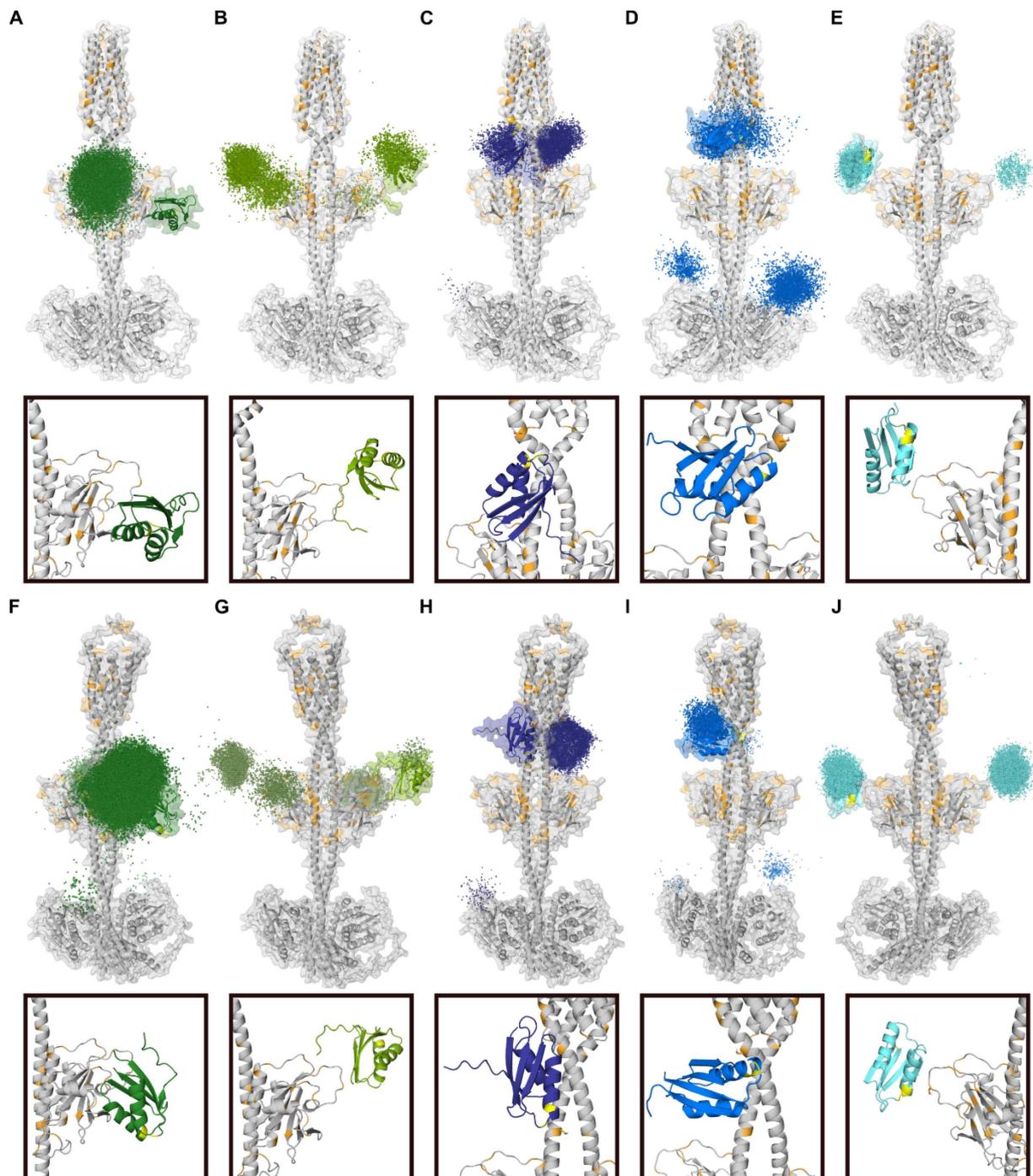


Figure 4: Density representation of all chaperone docking poses with ETR1 and best-scoring complexes. **A-E:** full-length *ab initio* ETR1. **F-J:** full-length ColabFold ETR1. Density representation of all ATX1 (A, F: dark green), CCH (B, G: yellow-green), MBD1 (C, H: purple), MBD2 (D, I: blue), and MBD3 (E, J: cyan) poses with ETR1 (gray) and the accordingly selected best-scored complex with the corresponding zoom. Amino acids forming the CBM in the chaperone are colored yellow. Residues of ETR1 able to complex Cu(I)-ions, such as cysteine, histidine, methionine, and serine are colored orange.

To obtain full-length models of the ETR1-RAN1 complex, a multimeric docking attempt was performed. The MBD1 of RAN1 is expected to be the most mobile MBD given that it is the first N-terminal MBD, has the longest linker of about 8 aa to MBD2, and, unlike MBD2 and MBD3, does not interact with the transmembrane domains of RAN1 in the AlphaFold structure. To mimic this enhanced mobility of MBD1 in the rigid docking approach, MBD1 itself and a truncated version of RAN1 lacking MBD1 were docked to ETR1 collectively. As in the preceding docking approach, the predictions of GLINTER were used as ambiguous restraints to guide the docking process. Moreover, unambiguous restraints were employed to represent the loop between MBD1 and MBD2, while allowing for their movement with respect to each other. The best-scored ETR1-RAN1 complexes obtained for both full-length ETR1 models demonstrate that even in the absence of membrane restraints, a spatial arrangement was identified in which the TMDs of ETR1 and RAN1 are located in the same membrane plane (Figure 5A, D). As observed in the aforementioned docking approach (Figure 4D, E, I, J), MBD2 and MBD3 bind to the same domains (Figure 5B, E). This suggests that the interactions predicted by GLINTER and those generated by HADDOCK in the context of a full-length ETR1-RAN1 complex are consistent. In contrast to the aforementioned docking approach, MBD1 is now located at the GAF domain of ETR1 (Figure 5B, E). Given that MBD2 is already situated at the linker region of ETR1, and that the loop between MBD1 and MBD2 is too short to accommodate the binding of MBD1 on the opposite side, an alternative interaction site in the vicinity of the other monomer's GAF-domain is proposed for MBD1 (Figure 5C). This is in line with the interaction observed for the soluble chaperones ATX1 and CCH (Figure 4A, B). The density representations of the MBDs across all ETR1-RAN1 complexes show a consistent pattern in both models, with MBD1 binding to the GAF domain, MBD2 to the linker region, and MBD3 to the side of the GAF domain (Figure 5C, F). An alternative hypothesis is that MBD1 and MBD2 bind sequentially, which would allow binding to similar regions.

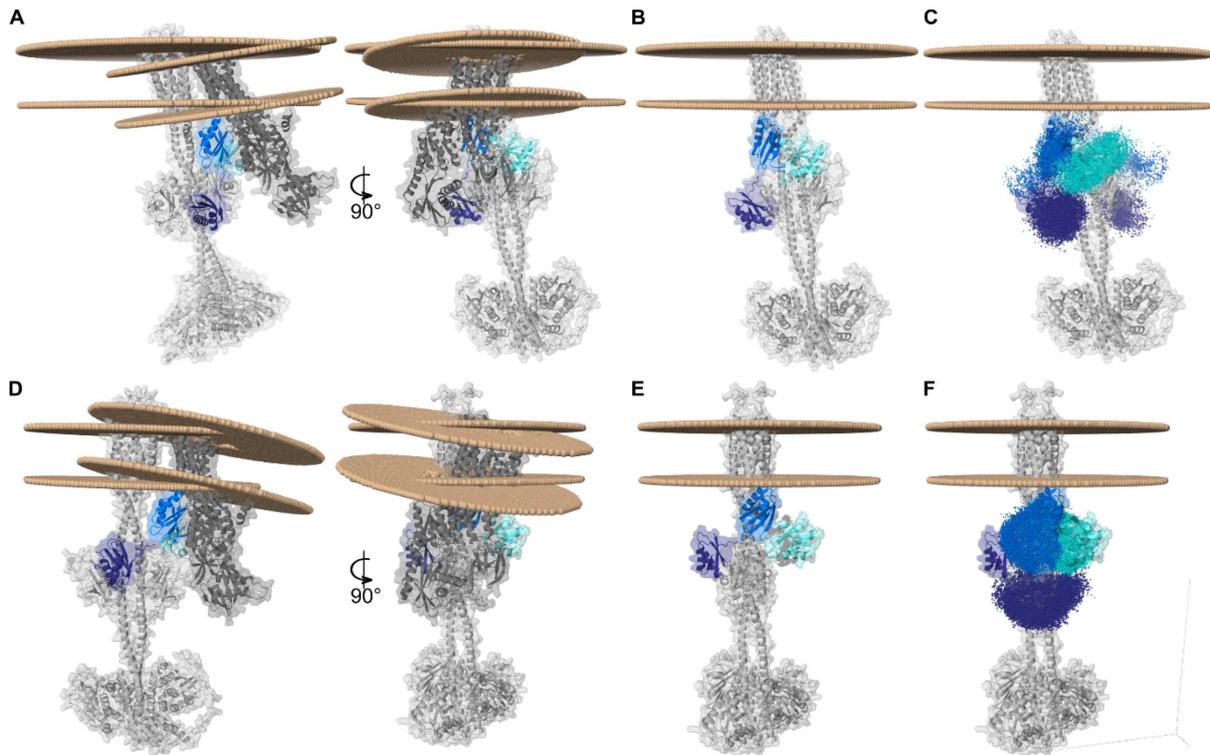


Figure 5: Model of the ETR1-RAN1 complex. The models indicate binding positions of the individual MBDs as obtained in previous results (Figure 3, 4) and the orientation of RAN1 and ETR1 in relation to the membrane. The three MBDs are colored purple (MBD1), blue (MBD2), and cyan (MBD3). An alternative interaction site of MBD1 in the vicinity of the GAF domain is predicted. MBD2 and MBD3 bind to the same domains as in the initial docking approach. **A:** Membrane orientation of RAN1 and full-length *ab initio* ETR1 after docking. **B:** Truncated RAN1 lacking MBD1 and MBD1 were collectively docked to full-length *ab initio* ETR1. The remaining domains of RAN1 are hidden for the sake of clarity. **C:** Density representation of MBD1, MBD2, and MBD3 poses at full-length *ab initio* ETR1 **D:** Membrane orientation of RAN1 and full-length ColabFold ETR1 after docking. **E:** Truncated RAN1 and MBD1 docked to full-length ColabFold ETR1. The remaining domains of RAN1 are hidden for the sake of clarity. **F:** Density representation of MBD1, MBD2, and MBD3 poses at full-length ColabFold ETR1.

The recently published AlphaFold3 has demonstrated substantial improvements in accuracy over many previous protein complex prediction tools (Abramson *et al.*, 2024). The new AlphaFold version predicts an ETR1-RAN1 complex with transmembrane domains in a similar orientation. However, the transmembrane domains of ETR1 and RAN1 are arranged such that they would not be located in the same membrane plane (Figure S2C). As with the HADDOCK results, MBD3 of RAN1 is placed at the GAF domain of ETR1, with MBD2 positioned directly at the linker region (Figure S2D). Similar to the HADDOCK results, MBD1 is positioned between the GAF domain and the ETR1 linker region on the opposite side of ETR1, with the CBM oriented towards the GAF domain (Figure S2C). Overall, the local interactions predicted by AlphaFold3 are consistent with the aforementioned protein-protein docking results.

Interaction of RAN1 MBDs with soluble copper chaperones ATX1 and CCH

Next, we studied the interactions of individual RAN1 MBDs with soluble copper chaperones ATX1 and CCH. This was to determine whether there is a preference for an MBD to bind to one of these chaperones and whether this binding is more likely than binding to ETR1. All MBD/chaperone combinations showed binding, yet overall, ATX1 was clearly preferred to CCH, as evidenced by the 10-20 fold higher affinities of MBD1 and MBD2 and a similar affinity of MBD3 for ATX1 in comparison to CCH. The affinity differences observed here with the single MBDs are higher than those found in ref. (Hoppen *et al.*, 2019) with the N-terminal RAN1 tail containing all three MBDs, which might indicate additional steric influences when all three MBDs are present. The apparent K_D -values are 154 ± 53.7 nM (ATX1-MBD1), 238.8 ± 86.8 nM (ATX1-MBD2), 105.3 ± 78.9 nM (ATX1-MBD3) versus 3164.7 ± 683.6 nM (CCH-MBD1), 2778.3 ± 989.9 nM (CCH-MBD2) and 88.5 ± 78.2 nM (CCH-MBD3) (Figure 6A, B). The binding studies indicate that ATX1 is the preferred interaction partner of the RAN1 MBDs, putatively due to the shielding effect of the additional C-terminal domain in CCH for MBD1 and MBD2 (Himmelblau *et al.*, 1998). Note that binding of ATX1, CCH, and CCH Δ to the full-length RAN1 is ~4-5 times stronger than to the N-terminal tail of RAN1 (Hoppen *et al.*, 2019) or the single MBDs (Figure 6). This observation may be attributed to the fact that the degrees of freedom in the unbound state are more restricted when the MBDs are attached to the remainder of RAN1 but binding of copper chaperones to the ATPase's translocon is also a plausible explanation since such an interaction provides an additional binding site and has been described before (Gonzalez-Guerrero and Arguello, 2008; Padilla-Benavides *et al.*, 2013).

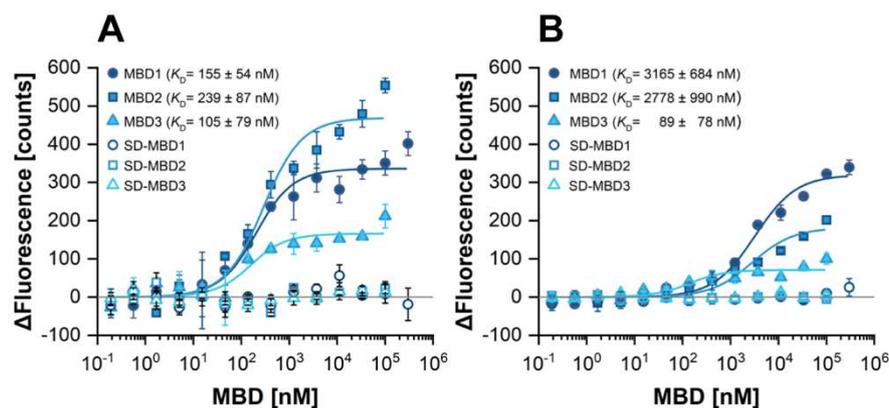


Figure 6: Interaction of RAN1 MBDs 1 to 3 with the soluble copper chaperones ATX1 and CCH studied by microscale thermophoresis (MST). **A:** ATX1 and **B:** CCH are the labeled proteins. Data were fit to a one-site binding model and the obtained dissociation constants (K_D) are reported in the figure. In all subfigures, symbols represent experimental data and solid lines represent fitted data. All measurements were performed at least in triplicate.

In light of the HADDOCK results, the copper relay hypothesis, and the experimentally determined interaction of MBDs with soluble chaperones, structural models of heterodimers of ATX1, CCH Δ , and MBDs were predicted using ColabFold 1.5.2 (Mirdita *et al.*, 2021) (Figure 6 A to D). All individual monomers display the characteristic ATX1-like fold. The proposed heterodimers of ATX1, CCH, MBD1, and MBD2 are oriented in a face-to-face arrangement (Keller *et al.*, 2012). This is in contrast to the heterodimers that have been predicted for MBD3. ATX1 and CCH form either face-to-face (Keller *et al.*, 2012) or face-to-back dimers (Keller *et al.*, 2012) with MBD3. MBD1 and MBD2 form back-to-back dimers exclusively with MBD3, which prevents the CBMs from approaching the other domain. As the complexes generated by ColabFold do not take into account the fact that MBD1 and MBD2 are connected by a linker of approximately eight residues, MODELLER 10.5 (Eswar *et al.*, 2006) was employed to generate a complete model (Figure 7E). This model underlines that a direct copper transfer from the soluble chaperones ATX1 and CCH to MBD1, and subsequently from MBD1 to MBD2, is feasible from the structural perspective (Figure 7), which is further supported by known structural arrangements of homologous complexes (Banci *et al.*, 2006; Rodriguez-Granillo and Wittung-Stafshede, 2008).

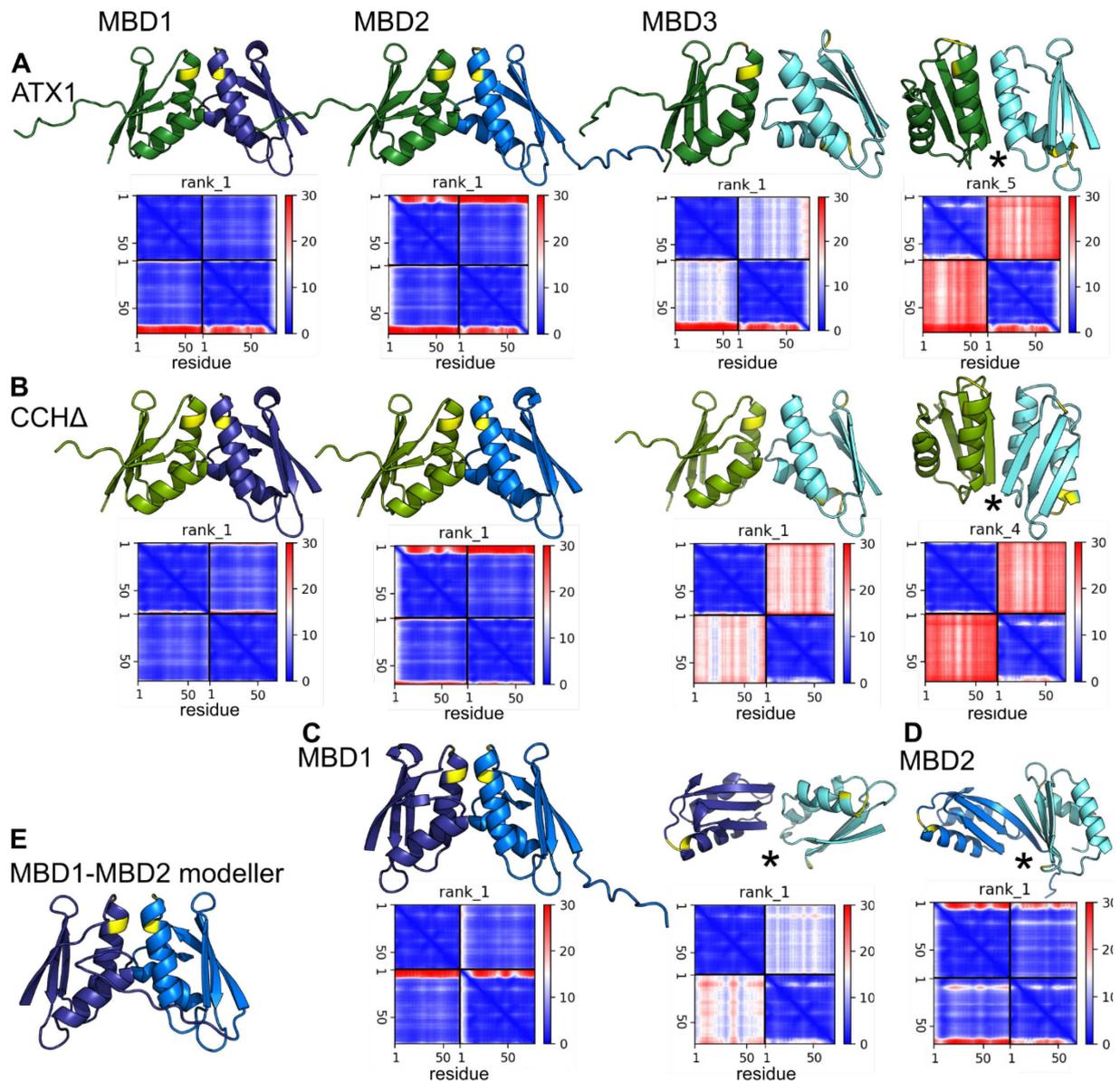


Figure 7: Putative models of the individual copper chaperones ATX1, CCH Δ , MBD1, MBD2, and MBD3 (ATX1: dark green, CCH Δ : light green, MBD1: purple, MBD2: blue, MBD3: cyan) and corresponding PAE (predicted alignment error matrix). All individual monomers have the typical ATX1-like fold. The heterodimers of ATX1, CCH, MBD1, and MBD2 orient in a face-to-face conformation. The soluble chaperones ATX1 and CCH from face-to-face and back-to-face dimers with MBD3. MBDs 1 and 2 form back-to-back dimers with MBD3. **A:** Proposed ATX1-MBD heterodimers. **B:** Proposed CCH-MBD heterodimers. **C:** Proposed MBD1-MBD heterodimers. **D:** Proposed MBD2-MBD3 heterodimer. **E:** MBD1-MBD2 heterodimer built based on the ColabFold prediction using MODELLER 10.5. Copper binding motifs are colored yellow.

Discussion

Previous research demonstrated potential direct interactions between the soluble copper chaperones ATX1 and CCH and the ER-bound copper-transporting P-type ATPase RAN1 with the ethylene receptor ETR1 (Hoppen *et al.*, 2019). This provided the first insights at the molecular level into receptor metalation, which is required for the sensing of and the signaling and plant response to the ethylene plant hormone. In the present study, we further dissected these interactions and propose possible structural models of copper chaperones ATX1, CCH, full-length RAN1, and individual RAN1 MBDs with the ethylene receptor ETR1 aiming to gain further insight into the sequence and molecular mechanisms underlying receptor metalation.

AI-driven methods for predicting protein structures, like AlphaFold, RoseTTAFold, and D-I-TASSER, offer unparalleled insights into the structures of individual proteins and their multimeric complexes. In this work, the AlphaFold2 structure prediction of RAN1 was corroborated by a sequence-based analysis of RAN1, which identified two MBDs in the N-terminal region. Notably, AlphaFold2 predicted a third soluble domain adopting the ATX1-like fold (therefore termed MBD3), which was not predicted by the sequence-based domain identification, likely due to the absence of a CBM in this domain. In contrast, the domain boundary prediction method TopDomain (Mulnaes *et al.*, 2021b) also identified three MBD (Figure S1C). The ATX1-like fold and the existence of a third domain (MBD3) were confirmed experimentally by X-ray crystallography. The obtained crystal structure of MBD3 (Figure 1C) is consistent with the structure predicted by AlphaFold2 (C_{α} atom RMSD < 1 Å). Consequently, all three MBD domains were utilized for the structural prediction of ETR1-RAN1 and MBD-chaperone complexes.

First, GLINTER was used to predict possible interactions or contact sites between soluble chaperones ATX1 and CCH or the MBDs of RAN1 with ETR1. The data indicate that the interaction interfaces among the three MBDs are separated and that MBD3 is more likely to interact with ETR1 than ATX1 and CCH, particularly with the receptor's GAF domain (Figure 3). Subsequent docking experiments using the full-length forms of ETR1 and RAN1 revealed that MBD3 is positioned at the ETR1 GAF domain (Figures 5). This suggests that this interaction is also feasible when the structural characteristics and restraints of ETR1 and RAN1 are taken into account. Further support for our model that RAN1 engages in complex formation with ETR1 through its MBDs is provided by previous studies on P-type ATPases, which have demonstrated that their complex formation, e.g., in the context of dimerization, is facilitated by their cytosolic domains (Zeinert *et al.*, 2024)

Further computational studies in this work on potential dimeric interactions between the MBDs or with the soluble copper chaperones revealed that heterodimers involving MBD3 assemble

face-to-face but also face-to-back or back-to-back (Figure 7). Naturally, direct copper transfer between MBD3 and MBD1 or MBD2 would not be feasible in such assemblies, although the degenerate MBD3 is still capable of copper binding, as demonstrated by our copper binding studies (Figure 2B). Hence, MBD3 in RAN1 may serve a different function such as a regulatory role as described for other MBDs (Bitter *et al.*, 2022; Guo *et al.*, 2024). However, this does not preclude the aforementioned hypothesis that MBD3 may serve as an anchor in RAN1-ETR1 complex formation, particularly when considering our findings regarding contact site predictions through GLINTER, which makes use of coevolutionary information (Xie and Xu, 2022) (Figure 3).

Due to the low signal-to-noise ratio, the K_D of the MBD3-ETR1 interaction calculated from the *in vitro* binding studies shows a higher relative variance than for the interaction of MBD1 and MBD2 with the receptor (Figure 2D). Nevertheless, the data still suggest a somewhat higher affinity for the interaction of MBD3 with ETR1 than for the other MBDs, which is in line with the previously proposed anchor function of MBD3 in ETR1-RAN1 complex formation. The comparable affinities of MBD1 and MBD2 ($K_D = 13 \pm 4 \mu\text{M}$ and $22 \pm 12 \mu\text{M}$) might suggest that both MBDs bind to overlapping sites on ETR1. This hypothesis is further supported by the high structural and sequence similarity of the MBDs. Furthermore, this is in line with our docking experiments with the individual MBDs. Our results indicate that MBD1 and MBD2 are located at the ETR1 linker region, in close proximity to the ETR1 TMD where the copper cofactor is bound (Figure 4 and 5), and they do this via interactions around their CBM. Once loaded with copper, the MBDs could transfer copper ions to the receptor, suggesting a mechanism by which the receptor receives its copper cofactor. Previous copper loading of the MBDs, on the other hand, can be achieved by a copper transfer from soluble chaperones ATX1 or CCH through direct interaction. To this end, our *in vitro* interaction studies demonstrated that the binding of ATX1 to MBDs 1 to 3 is favored over the binding of MBDs to CCH (Figure 6A, B). This is consistent with the previous hypothesis that ATX1 and CCH fulfill different tasks, given that they are inversely regulated under conditions of excess copper and copper deficiency (del Pozo *et al.*, 2010). ATX1 is regarded as the primary factor in intracellular copper transport, while CCH is supposed to be predominantly involved in intercellular copper transport facilitating the remobilization of copper from decaying plant organs (Mira *et al.*, 2001). The proposed copper transfer mechanism is in accordance with our *in vitro* experimental data on MBD-chaperone formation (Figure 6A, B) and is further corroborated by the published literature on MBD-chaperone interaction (Arnesano *et al.*, 2002; Pufahl *et al.*, 1997; Walker *et al.*, 2002; Wernimont *et al.*, 2000).

The copper binding assay shown in Figure 2 indicates that MBD1 and MBD2 similarly compete for copper, as evidenced by the obtained apparent K_D values ($4.78 \times 10^{-14} \text{ M}$; $8.89 \times 10^{-14} \text{ M}$).

As the thermodynamic driving force due to the difference in the two K_D values is negligible, Cu(I) will likely be transferred *in vivo* to the most readily accessible MBD, which is MBD1 in the structural context of RAN1 and more specifically the RAN1-ETR1 complex (Figure 5C, F). Our docking studies identified two different interaction sites of MBD1 with ETR1. These include the linker region, which also encompasses the MBD2 binding site (Figure 4), and the GAF domain of ETR1, which is also recognized by ATX1 and CCH (Figure 4, 5). Furthermore, the study of heterodimers comprising MBD1 and either ATX1 or CCH indicates that these heterodimers adopt a face-to-face conformation, thereby enabling a direct copper transfer. Hence, MBD1 should be able to accept copper from the soluble chaperones ATX1 and CCH, although binding of CCH may be less likely due to the lower affinity for MBD1. The apparent dissociation constant of Cu(I) from ATX1 is reported to be $\sim 10^{-18}$ M (Xiao *et al.*, 2011) and therefore lower than the apparent K_D 's of Cu(I) from MBD1 and MBD2 determined in our study. Thus, there is no thermodynamic driving force for transferring Cu(I) from ATX1 to the MBDs. It was suggested in a similar context that copper trafficking proteins overcome the extraordinary copper chelation capacity of the cytoplasm by catalyzing the rate of copper transfer between physiological partners (Huffman and O'Halloran, 2000). Hence, the metallochaperones could work like "enzymes", carefully tailoring energetic barriers along specific reaction pathways but not others.

The results of our docking experiments indicate that MBD2 is located in close proximity to the linker region and the TMD of ETR1 (Figure 2 and 3). Furthermore, computational predictions on dimeric interactions among the MBDs and with soluble copper chaperones indicate that heterodimers of MBD1 and MBD2 adopt a face-to-face conformation. Hence, a direct copper transfer seems feasible, given the proximity of the CBMs. This is supported by the K_D values of MBD1 or MBD2 for Cu(I), which are ~ 40 to 80 -fold higher than the dissociation constant of copper from the ETR1_TMD (Schott-Verdugo *et al.*, 2019), which would provide a thermodynamic driving force for the Cu(I) transfer to the TMD of ETR1. In ref. (Zimmermann *et al.*, 2009), an apparent dissociation constant of K_D of 7.94×10^{-19} M was reported for MBD1 (termed HMA7n there), where BCS was used as a probe in the competition rather than BCA. Further differences may arise because the apparent dissociation constants of Cu(I)-transporting systems are pH-dependent (Xiao *et al.*, 2011). In light of the aforementioned results, and given the proximity of MBD2 to the TMD of ETR1, it seems plausible to suggest that MBD1 initially accepts copper from ATX1 and subsequently transfers this ion to MBD2, which then transfers it to ETR1. The RAN1 MBDs all have comparable affinities for ATX1, with an about 100 -fold higher binding affinity than that observed for ETR1, thereby favoring the interaction with ATX1. Although the affinity of the individual MBDs for ETR1 is lower than for ATX1, the persistent presence of the MBDs at the membrane and their proximity to ETR1

permit a subsequent transfer of the copper ion, particularly when the ETR1-RAN1 complex is formed.

The capacity of the degenerate MBD3 to bind monovalent copper was unexpected, given the established characteristics of a canonical degenerate MBD. However, further analysis revealed that this may be related to a solvent-accessible methionine in the MBD3 C-terminus that may form a Cu(I)-binding complex with a second methionine from an additional MBD3 monomer. Yet, such an assembly would involve a dimer complex that differs substantially from known structures of related copper chaperones such as Atox1 (Levy *et al.*, 2017; Perkal *et al.*, 2020). Nevertheless, previous studies have demonstrated that closely spaced methionines are capable of binding monovalent copper. This includes a conserved *MxxxM* motif within the transmembrane domain of yeast copper transporter Ctr3, which was identified as essential for copper transport across membranes (Puig *et al.*, 2002). Furthermore, it has been suggested that the copper transporter Ctr1 contains at least two methionines that coordinate a Cu(I)-ion within its pore (Ren *et al.*, 2019). Alternatively, the unexpected copper binding of MBD3 may be related to an *SSRS* sequence motif in its C-terminus that is also solvent-exposed (Figure 1D). *In vitro* and *in silico* experiments have demonstrated that such sequence motifs are capable of binding Cu(I) ions (Pavlin *et al.*, 2019; Stasser *et al.*, 2005). Nevertheless, the physiological relevance of this *SxxS* sequence motif remains to be elucidated as previously outlined by Pavlin *et al.* (2019) (Pavlin *et al.*, 2019). This may be achieved, for instance, through the analysis of *Cys-to-Ser* mutations, which are commonly used in analyzing the function of individual MBDs in P_{1B}-Type ATPases (Yatsunyk and Rosenzweig, 2007) and in investigating Cu(I):protein ratios of copper chaperones and enzymes (Heaton *et al.*, 2000; Stasser *et al.*, 2005). Finally, the copper affinity of MBD3 may be an effect of the isolated domain and not be present or relevant in the *in vivo* context if there is no transfer possibility from the soluble chaperones to MBD3 for steric reasons.

In conclusion, our data suggest that the individual MBDs in RAN1 may fulfill distinct roles in receptor complex formation in addition to regulating RAN1 (Figure S3). MBD3 may function as an anchor, stabilizing the RAN1-ETR1 complex while MBD1 and MBD2 are involved in a copper relay system. In this process, MBD1 is suggested to accept the copper ion from the soluble copper chaperone ATX1 (Figure S3, step 1.) and subsequently transfer it to MBD2 (Figure S3, step 2.). Given its proximity to the ETR1 TMD, MBD2 might transfer the copper ion to the receptor (Figure S3, step 3.). Similar findings have been observed in the yeast homolog Ccc2, where the first MBD has been characterized as an acceptor domain (Banci *et al.*, 2007). The hypothesis of a direct copper transfer from RAN1 to ETR1 via protein-protein interaction is supported by the previously identified direct interaction of ETR1 and RAN1, which was studied by fluorescence complementation in tobacco plants (Hoppen *et al.*, 2019), as well as

the described increase in ethylene binding by ETR1-containing, isolated yeast membranes when CuSO_4 is added (Binder *et al.*, 2007). These experimental findings collectively indicate that a membrane-bound protein mediates the transfer of copper to the receptor.

Methods

Structural models of copper chaperones ATX1, CCH and RAN1 MBDs

To date, no experimental structures of the copper chaperones ATX1, CCH, and RAN1 from *Arabidopsis thaliana* have been reported. Computational structural models are available within the AlphaFold database (identifiers: ATX1: Q94BT9, CCH: O82089, RAN1: Q9S7J8) (Jumper *et al.*, 2021). The structures of homologs from yeast, humans, and *Archaeoglobus fulgidus*, among others, have been resolved (sequence identity 43-32%, 40-25%, and 48-42%, ATX1, CCH, and RAN1, respectively). To differentiate the metal binding domains (MBDs) from unstructured parts or movable linkers, *TopDomain* from *TopSuite* (Mulnaes *et al.*, 2021b; Mulnaes *et al.*, 2021a) was used to perform a domain boundary prediction for CCH and RAN1. The predicted boundaries were applied to the corresponding AlphaFold2 structures of ATX1, CCH, and RAN1, to extract the metal-binding domains only. The obtained MBDs of ATX1, CCH (CCH Δ), and RAN1, were then used to predict putative chaperone-chaperone and chaperone-ETR1 interactions.

Prediction of structural models of chaperone-ETR1 interactions

Structural models of the chaperone-ETR1 interactions were generated using ColabFold 1.5.2 (Mirdita *et al.*, 2021). However, the results were inconsistent with the available experimental evidence (Hoppen *et al.*, 2019), as they either indicated no interaction or suggested interactions with the TMD of ETR1. Accordingly, we investigated potential interactions between the soluble copper chaperones ATX1, CCH Δ , MBD1-3, and ETR1. To this end, we employed GLINTER (Graph Learning of INTER-protein contacts), a deep learning method for predicting interfacial contacts of dimers (Xie and Xu, 2022). The GLINTER predictions are based on the PDB structures of the soluble copper chaperones (ATX1: aa 1-76, truncated CCH (CCH Δ): aa 1-76; aa 77-121 were omitted) as well as the MBDs of RAN1 (MBD1: aa 55-130, MBD2: aa 132-207, MBD3: aa 205-283), and the AlphaFold2 monomer structure of ETR1 (aa 1-307). We restricted ETR1 to residues 1-307 as previous *in vitro* binding studies have demonstrated that ATX1, CCH, and CCH Δ bind to ETR1 residues 1-157, but not to ETR1 residues 306-738. With regard to the N-terminal end of RAN1, stronger interactions were measured with residues 1-157 in comparison to residues 306-738 (Hoppen *et al.*, 2019). Consequently, the GAF domain of ETR1 (aa 158-306) was included, as this domain may represent a structural element that should be taken into account during docking. The twenty highest-ranked GLINTER-predicted interaction contacts were employed as restraints for protein-protein docking using HADDOCK2.4 (Dominguez *et al.*, 2003). At present, two computational models of the transmembrane domain of ETR1 are available (Jumper *et al.*, 2021; Schott-Verdugo *et al.*,

2019; Varadi *et al.*, 2022). It cannot be excluded that the discrepancies in the spatial orientations of the transmembrane helices and the connecting loops that are partially exposed to the cytoplasm may have an impact on the docking results. Consequently, a dimeric full-length ETR1 model featuring the transmembrane domain model proposed by AlphaFold2 was generated using ColabFold. Conversely, a dimeric full-length ETR1 model featuring the ab initio transmembrane model was merged with the cytosolic part of the ColabFold model using MODELLER 10.1. Prior to docking, the full-length ETR1 dimers were protonated using PROPKA3 (Olsson *et al.*, 2011) in Maestro (2023-2, 2023) with pH 7.4. The obtained protonation states were used to mimic physiological conditions and were incorporated into the docking using HADDOCK2.4 (Dominguez *et al.*, 2003). The protein-protein contacts predicted by GLINTER were used as ambiguous restraints with distances of 2 to 20 Å. Initial interaction models of ATX1, CCHΔ, and MBD1-3 of RAN1 with the two ETR1 models were obtained. Given that MBD1-3 are domains of RAN1, models of the ETR1-RAN1 interaction were created based on multimeric modeling of the proposed interactions of the individual MBDs with ETR1. Moreover, unambiguous restraints were employed to represent the loop between MBD1 and MBD2.

AlphaFold3 (Abramson *et al.*, 2024) is supposed to have an improved prediction potential for protein-protein complexes. To verify whether an improvement in the complex prediction also applies to ETR1/RAN1, the ETR1/RAN1 complex was remodeled (Figure S2). Models 1 to 3 show interaction models that are somewhat structurally related (RMSD < 10 Å). All MBDs are located less than 5 Å away from ETR1, with MBD1 positioned on the opposite side of ETR1 relative to MBD2 and MBD3. This is in contrast with model 4, in which the MBDs are all positioned on the same side of ETR1. All MBDs remain in the proximity of ETR1 within distances less than 5 Å. In model 5, none of the MBDs of RAN1 are directed towards ETR1. Based on these observations and the pLDDT and PAE values (Figure S2A, B), model 1 was further investigated.

The membrane plane orientation of ETR1 and RAN1 was predicted based on the structures of RAN1 (Uniprot: Q9S7J8) and the full-length ETR1 dimers employing the OPM3.0 server (Lomize *et al.*, 2022). The membrane plane orientations were obtained for both the HADDOCK and AlphaFold3 models to verify whether both transmembrane domains are located in the same membrane plane (Figure 5 and Figure S2).

Prediction of structural models of chaperone-chaperone interactions

Heterodimers of ATX1, CCH Δ , MBD1, MBD2 and MBD3 were predicted with ColabFold 1.5.2 (Mirdita *et al.*, 2021). The individual monomers show the typical ATX1-like fold, and for ATX1, CCH, and MBD1 and 2, the cysteines of the copper-binding motif “MxCxxC” are oriented in a face-to-face conformation, as anticipated from homologous structures in the Protein Data Bank (PDB) (Banci *et al.*, 2006) (*Saccharomyces cerevisiae*, Atx1-Cu(I)-Ccc2a complex PDB ID: 2GGP) (Rodriguez-Granillo and Wittung-Stafshede, 2008) and required for direct copper transfer. In the case of MBD3, face-to-face but also face-to-back and back-to-back conformations were predicted. The matrix over the PAE (predicted alignment error) indicates the high accuracy of the monomer and dimer models (Figure 4). As the complexes generated by ColabFold lack the linker connecting MBD1 and MBD2, which is of approximately eight residues in length, MODELLER 10.5 (Eswar *et al.*, 2006) was used to generate a complete model (Figure 4E).

Multiple sequence alignment

The amino acid sequences of the copper chaperones ATX1 and CCH as well as the metal-binding domains of P-type ATPases HMA5 and HMA7 (RAN1) from *Arabidopsis thaliana* were obtained from the UniProt database (Consortium, 2021). Amino acid sequences were subjected to a multiple sequence alignment using the Clustal Omega (Madeira *et al.*, 2022) webserver. Alignments were visualized using Jalview version 2.11.1.3 (Waterhouse *et al.*, 2009) and colored according to the Clustal X color scheme. Identifiers for the proteins/domains of proteins used for the multiple sequence alignment are: ATX1 (Q94BT9), CCH (O82089), HMA5 (Q9SH30), and HMA7 (RAN1) (Q9S7J8). Amino acid sequences of CCH, HMA5, and HMA7 were trimmed to encompass only the sequences of their metal binding domains, as indicated in the alignment. Sequences of MBD1-3 of HMA7 represent the amino acid sequences of the proteins used for the *in vitro* experiments.

Cloning

Plasmids for the heterologous expression of MBD1, MBD2, and MBD3 were constructed by inserting the corresponding coding DNA sequence into the pETEV16b plasmid backbone using the Gibson-assembly (Gibson *et al.*, 2009) method. The plasmid pETEV16b is derived from the pET-16b (Novagen) expression vector and contains a tobacco etch virus (TEV) protease cleavage site instead of the Factor Xa cleavage site present in plasmid pET-16b. The DNA inserts were generated by polymerase chain reaction (PCR) using primers listed in Table S3

and the expression vector pETEV16b-RAN1, a vector present in our laboratory containing the full-length coding sequence of *A. thaliana* RAN1 (Hoppen *et al.*, 2019), as a template. Polymerase chain reaction (PCR) products were generated using Q5 high-fidelity DNA polymerase (NEB), subjected to treatment with DpnI (NEB) to remove the methylated DNA template and purified using the Illustra™ GFX™ PCR DNA and gel band purification kit (Cytiva). The purified PCR products were used at a 3:1 ratio (insert:vector backbone) in the Gibson-assembly reaction to generate the final expression vectors. For this, a master mix containing DNA polymerase, exonuclease, and DNA ligase was added followed by incubation at 50°C for 60 min. DNA sequences were confirmed by Sanger-sequencing (Microsynth Seqlab).

Expression and purification of recombinant proteins

The heterologous expression of MBDs was achieved by transforming *E. coli* BL21 Gold (DE3) cells (Stratagene) with the corresponding expression plasmid and selecting them on 1.5% (w/v) 2YT-agar plates (5 g/l NaCl, 10 g/l yeast extract, 15 g/l tryptone, pH 7.3) containing 100 µg/ml ampicillin. The expression of ETR1_GAF¹⁻³¹⁶ was achieved using *E. coli* C41(DE3)ΔompFΔacrAB (Kanonenberg *et al.*, 2019) (referred to as C41ΔΔ in the henceforth) and the expression vector pETEV16b_ETR1_GAF¹⁻³¹⁶ were used. A 500 ml overnight culture was grown in 2YT medium supplemented with 100 µg/ml ampicillin in a 1 l unbaffled Erlenmeyer flask at 30°C while shaking at 180 rpm. The overnight cultures were then used to inoculate expression cultures to a starting OD₆₀₀ of 0.15. Expression cultures consisting of 500 ml 2YT-medium supplemented with 100 µg/ml ampicillin and 2% (v/v) ethanol in 1 l baffled Erlenmeyer flasks were grown at 30°C while shaking at 180 rpm. The cultures for the expression of ETR1_GAF¹⁻³¹⁶ in *E. coli* C41ΔΔ did not contain ethanol. The temperature was reduced to 16°C as soon as the expression cultures reached an OD₆₀₀ of 0.4. Protein expression was induced by the addition of isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) to a final concentration of 0.5 mM when cultures reached an OD₆₀₀ between 0.6 and 0.8. Cells were further grown over night (17-20 h) and harvested by centrifugation at 7,000xg for 15 min and 4°C. They were then flash-frozen in liquid nitrogen and stored at -20°C until further use. Typically, 6 l of culture medium was used for a single expression.

For purification, cells were resuspended in a lysis buffer (see below) containing DNaseI (PanReac AppliChem) and lysed by passing twice through a cell disruption system (Constant Systems Limited) at 2 kbar and 5°C for MBDs and 2.4 kbar for ETR1_GAF¹⁻³¹⁶. For MBDs, lysis buffer A (300 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1 mM DTT, 10% (w/v) glycerol, 0.002% (w/v) PMSF, pH 7.2) was used whereas lysis buffer B (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl,

10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 10% (w/v) glycerol, 0.002% (w/v) PMSF, pH 8.0) was used for ETR1_GAF¹⁻³¹⁶. In order to purify the membrane protein ETR1_GAF¹⁻³¹⁶, cell membranes were isolated first and membrane proteins were solubilized using detergent. Therefore, the cell lysate was centrifuged at 14,000xg for 30 min and the supernatant was subjected to a second centrifugation at 40,000xg for 30 min. The supernatant was discarded and membrane pellets were washed by resuspending in lysis buffer B. Finally, membranes were isolated by centrifugation at 34,000xg for 30 min, shock frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until further use (Schott-Verdugo *et al.*, 2019). ETR1_GAF¹⁻³¹⁶ was solubilized by resuspending membrane pellets at a final concentration of 30 mg/ml in solubilization buffer (200 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, 1.5% (w/v) Fos-Choline-14, 0.002% (w/v) PMSF, pH 8.0) and gentle stirring for one hour at 4°C. The cell lysates of soluble MBDs or the solubilized membranes were then cleared by ultracentrifugation at 100,000xg for 1 h (MBDs) or 230,000xg for 30 min (ETR1_GAF¹⁻³¹⁶). Proteins were purified by immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) using an ÄKTAPrime plus system (GE Healthcare, Illinois, USA). In order to purify the MBDs, supernatants of the cleared cell lysates were loaded on two connected 5 ml HisTrap FF Ni-NTA columns (GE Healthcare) equilibrated in lysis buffer A. The column was washed with at least 30 column volumes (CV) of lysis buffer A followed by a second washing step of 15 CV using lysis buffer A + 100 mM imidazole to remove unspecifically bound proteins. MBDs were then eluted using lysis buffer A + 500 mM imidazole. Elution fractions were pooled, concentrated to a sample volume of 2.5 ml using a 3 kDa molecular weight cut-off (MWCO) Amicon™ Ultra-15 centrifugal filter (Millipore) and buffer exchanged into lysis buffer A on a PD-10 desalting column (Cytiva). Protein concentration was determined based on the absorption at 280 nm and the corresponding molar extinction coefficient, which was calculated from the amino acid sequence using the ProtParam tool (Gasteiger *et al.*, 2005). Glycerol from an 80% (w/v) stock solution was added to a final concentration of 20% (w/v) followed by flash-freezing in liquid nitrogen and storage at -80°C. Homogeneity of proteins was achieved by size exclusion chromatography (SEC). For this, proteins were thawed on ice and a 500 µL sample was loaded onto a Superdex Increase™ 75 (Cytiva) column equilibrated in degassed SEC buffer (300 mM NaCl, 50 mM HEPES, pH 7.2). The flow rate used for SEC was 0.2 ml/min. Elution fractions were pooled, concentrated using 0.5 ml centrifugal filters with a 3 kDa MWCO (Millipore), and prepared for storage as described above. For storage, samples were divided into 30-50 µl aliquots in PCR reaction tubes. All steps were carried out at 4°C. However, samples of MBD3 were concentrated at 10°C and thawed at room temperature due to the poor solubility of MBD3 at low temperatures. ETR1_GAF¹⁻³¹⁶ was purified in a similar way to the full-length receptor as described in (Milic *et al.*, 2018) with some minor changes. In short, the supernatant from the centrifuged, solubilized membranes was loaded onto a 5 ml HisTrap FF Ni-NTA (GE Healthcare, Illinois, USA) that had been equilibrated in buffer A (200 mM NaCl,

50 mM Tris/HCl, 0.015% (w/v) Fos-Choline-14, 0.002% PMSF, pH 8.0). The column was then washed with 50 CV buffer A, 20 CV ATP buffer (buffer A + 50 mM KCl, 20 mM MgCl₂, and 10 mM adenosine triphosphate (ATP)), again with 10 CV buffer A and 4 CV buffer A + 50 mM imidazole in order to remove unspecifically bound proteins. ETR1_GAF¹⁻³¹⁶ was eluted from the resin by the addition of buffer A + 250 mM imidazole, concentrated to a final volume of 2.5 ml using an Amicon™ Ultra-15 centrifugal filter with a 10 kDa MWCO (Millipore) and used directly for labeling with AlexaFluor™ 488-NHS (ThermoFisher Scientific). Copper chaperones ATX1 and CCH were expressed and purified as previously described in reference (Hoppen *et al.*, 2019).

Labeling of recombinant proteins for microscale thermophoresis

Freshly purified ETR1_GAF¹⁻³¹⁶ was buffer exchanged into labeling buffer (300 mM NaCl, 50 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 0.015% (w/v) Fos-Choline-14, pH 8.0) using a PD-10 desalting column (Cytiva, Marlborough, USA) and concentrated to a volume of 2.5 ml as described above. A 10 mg/ml stock solution of the amine-reactive dye AlexaFluor™ 488-NHS (ThermoFisher Scientific) was prepared in anhydrous dimethyl sulfoxide (DMSO). From this stock, the dye was added to the protein in a 2.5-fold molar excess and the reaction mixture was incubated on a rotary shaker at room temperature for 1 h in the dark. The reaction was then quenched by buffer exchange into storage buffer (300 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, 0.015% (w/v) Fos-Choline-14, pH 8.0) using a PD-10 desalting column (Cytiva) to efficiently remove unreacted dye and labeling buffer components. The labeled protein was then subjected to centrifugation at 230,000xg and 4°C for 30 min. The supernatant was transferred to a fresh reaction tube and the degree of labeling (DOL) as well as the protein concentration were determined as described by the manufacturer. The sample was stored with 20% (w/v) glycerol added and split into 50 µl aliquots. These aliquots were then flash-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Copper chaperones ATX1 and CCH were labeled as described in (Hoppen *et al.*, 2019). All labeled proteins had a DOL of between 50% and 100%.

Microscale thermophoresis

AlexaFluor488™-labeled ETR1_GAF¹⁻³¹⁶ was diluted in MST-F buffer (300 mM NaCl, 50 mM HEPES, 0.03% (w/v) Fos-Choline-14, pH 7.2) to a concentration of 100 nM. Aliquots of MBDs were first diluted to a glycerol concentration of 10% (w/v) using SEC buffer and then further diluted to 200 µM using MST-G buffer (300 mM NaCl, 50 mM HEPES, 10% (w/v) glycerol, pH 7.2). First, serial dilution series of MBDs ranging from 200 µM to 48.8 nM were prepared in MST-G buffer. Next, equal volumes of the dilution series and labeled ETR1_GAF¹⁻³¹⁶ were

mixed resulting in final concentrations of MBDs ranging from 100 μM to 24.4 nM and 50 nM of labeled ETR1_GAF¹⁻³¹⁶. Samples were then incubated for 10 min in the dark prior to loading into premium glass capillaries. Measurements were performed on a Monolith NT.115 (both NanoTemper Technologies) with the excitation power set to 50% and the MST power set to 40%. The same settings were used for interactions of labeled ATX1 and MBDs. However, for interaction studies involving labeled CCH, the LED power had to be adjusted to 80% while the MST power remained at 40%. AlexaFluor488TM-labeled copper chaperones ATX1 and CCH were pre-diluted in MST-T buffer (300 mM NaCl, 50 mM HEPES, 0.1% (w/v) Tween20, pH 7.2) to a concentration of 200 nM and added to the dilution series of the individual MBDs. For microscale thermophoresis experiments investigating the interaction of ATX1 or CCH with MBDs, 1:2 dilution series of MBDs were prepared in MST-G buffer. Final concentrations of labeled ATX1 or CCH were 100 nM, while concentrations of MBD1 ranged from 300 μM to 0.19 nM. Final concentrations of MBD2 and MBD3 ranged from 100 μM to 0.19 nM (MBD2) and 0.06 nM (MBD3). Interactions of individual MBDs with labeled ETR1_GAF¹⁻³¹⁶ were analyzed using thermophoresis with T-jump as the evaluation strategy. For experiments involving labeled copper chaperones ATX1 or CCH, initial fluorescence was chosen for data analysis due to strong, concentration-dependent changes in the initial fluorescence at increasing MBD concentrations. For these samples, SD-tests were performed according to the manufacturer to exclude material loss as a cause for changes in initial fluorescence. Data were fit to a one-site binding model using the MO.Affinity Analysis software v2.1.5 (NanoTemper Technologies). All measurements were performed in triplicate at room temperature.

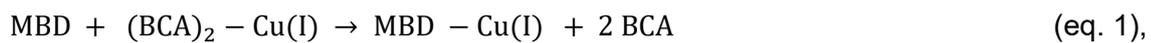
Copper Binding of MBDs

The appropriate volume of SEC-purified MBDs was added to a final volume of 150 μl , with a 20-fold molar excess of DTT using SEC buffer for dilution. The sample was then incubated for one hour either on ice (MBD1 and MBD2) or at room temperature (MBD3) to fully reduce the protein. The DTT was then removed by applying 75 μl of sample onto ZebaTM spin desalting columns (ThermoFisher Scientific) with a 7 kDa MWCO, equilibrated in buffer SEC, according to the protocol provided by the manufacturer. Elution fractions were pooled and further diluted to a final volume of 350 μl . The protein concentration was determined spectrophotometrically based on the absorption at 280 nm, as described above. Subsequently, a 1:1 dilution series consisting of 12 serial dilution steps was prepared using buffer SEC. The dilution series started at the concentration of the sample used to determine the protein concentration, and an additional sample of SEC buffer only was prepared. From the dilution series, 50 μl samples were transferred to a transparent flat-bottom 96-well microtiter plate (Sarsted) and mixed with an equal volume assay buffer (300 mM NaCl, 50 mM HEPES, 2 mM sodium ascorbate,

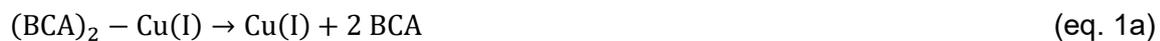
100 μM BCA, 40 μM CuCl, pH 7.5). Assay buffer was added last using a multichannel pipette and absorption at 562 nm was recorded on a Tecan infinite M200 Pro plate reader (Tecan) to monitor the transfer of copper from the chromophoric Cu(I)-BCA₂-complex to the protein. Control samples probing for residual DTT were treated the same as the MBD samples but did not contain protein. In a further control experiment, a protein (MSP1E3) containing a deca-histidine tag was used to study the effect of the deca-histidine tag in the competition assay.

Measurements were performed in triplicate and all steps were carried out at room temperature unless stated otherwise. Data were fitted to a four-parameter logistic function with a shared Hill coefficient. In order to better identify differences in MBDs copper binding abilities, the Hill coefficient was adjusted by the fitting algorithm. Data were plotted and analyzed using OriginPro (Version 2021b, OriginLab Corporation).

The reaction of the purified MBD with BCA₂-Cu(I) is described by the equilibrium



which consists of the two partial reactions



and



The individual equilibrium constants for eq. 1 and the total Cu(I) concentration are

$$K_{\text{D MBD-Cu(I)}} = \frac{[\text{MBD}][\text{Cu(I)}]}{[\text{MBDCu(I)}]} \quad (\text{eq. 2})$$

$$\beta_2([\text{(BCA)}_2\text{Cu(I)}]) = \frac{[\text{(BCA)}_2\text{Cu(I)}]}{[\text{Cu(I)}][\text{BCA}]^2} \quad (\text{eq. 3})$$

$$\text{Cu(I)}_{\text{tot}} = [\text{Cu(I)}] + [\text{MBD} - \text{Cu(I)}] + [(\text{BCA})_2\text{Cu(I)}] \quad (\text{eq. 4})$$

Using an approximation related to Cheng and Prusoff (Cheng and Prusoff, 1973), [MBD-Cu(I)] and [(BCA)₂Cu(I)] from eq. 4 can be substituted with the corresponding equilibrium expressions (eqs. 2 and 3)

$$Cu(I)_{tot} = [Cu(I)] + \frac{[MBD][Cu(I)]}{K_D MBD-Cu(I)} + \beta_2 [Cu(I)] [BCA]^2 \quad (\text{eq. 5a})$$

$$Cu(I)_{tot} = [Cu(I)] \left(1 + \frac{[MBD]}{K_D MBD-Cu(I)} + \beta_2 [BCA]^2 \right) \quad (\text{eq. 5b})$$

Replacing $[Cu(I)]$ in eq. 3 with the expression from eq. 5b yields

$$\beta_2 = \frac{[(BCA)_2 Cu(I)]}{[Cu(I)] [BCA]^2} = \frac{[(BCA)_2 Cu(I)]}{Cu(I)_{tot} [BCA]^2} \left(1 + \frac{[MBD]}{K_D MBD-Cu(I)} + \beta_2 [BCA]^2 \right) \quad (\text{eq. 6})$$

Rearranging to isolate $[(BCA)_2 Cu(I)]$ yields

$$\frac{\beta_2 Cu(I)_{tot} [BCA]^2}{\left(1 + \frac{[MBD]}{K_D MBD-Cu(I)} + \beta_2 [BCA]^2 \right)} = [(BCA)_2 Cu(I)] \quad (\text{eq. 7})$$

We now consider that the EC50 value is defined as the protein concentration at which the $[BCA_2 Cu(I)]$ signal is half the signal when no protein is present. Note that due to the BCA excess in the experimental setup, the free BCA concentration is different when protein is present ($[BCA_{w/ \text{protein}}]$ or not $[BCA_{w/o \text{ protein}}]$)

$$\frac{\beta_2 Cu(I)_{tot} [BCA_{w/ \text{protein}}]^2}{\left(1 + \frac{EC50}{K_D MBD-Cu(I)} + \beta_2 [BCA_{w/ \text{protein}}]^2 \right)} = \frac{1}{2} \frac{\beta_2 Cu(I)_{tot} [BCA_{w/o \text{ protein}}]^2}{\left(1 + \beta_2 [BCA_{w/o \text{ protein}}]^2 \right)} \quad (\text{eq. 8})$$

Thus, $K_D MBD-Cu(I)$ can be calculated from the EC50 value, the respective BCA concentrations, and previous estimates of the formation constant of $BCA_2-Cu(I)$, $\beta_2 = 2 \times 10^{17} \text{ M}^{-2}$ (Xiao *et al.*, 2008).

$$K_D MBD-Cu(I) = \frac{[BCA_{w/o \text{ protein}}]^2 EC50}{2[BCA_{w/ \text{protein}}]^2 - [BCA_{w/o \text{ protein}}]^2 + [BCA_{w/ \text{protein}}]^2 [BCA_{w/o \text{ protein}}]^2 \beta_2} \quad (\text{eq. 9})$$

The EC50 values for the copper transfer from the chromophoric $Cu(I)-BCA_2$ complex to MBDs 1 to 3 are given in Figure 2B.

$[BCA_{w/o \text{ protein}}]$ was determined as the initial BCA concentration before protein addition, representing the BCA excess ($10 \times 10^{-6} M$). $[BCA_{w/ \text{ protein}}]$ was determined as the BCA concentration after protein addition at which the excess of BCA and 50% of the previously bound BCA are free, corresponding to a reduction of the $BCA_2Cu(I)$ signal by half as Cu binds to the protein ($30 \times 10^{-6} M$).

This then leads to

$$K_{D \text{ MBD1-Cu(I)}} = 4.78 \times 10^{-14} M$$

$$K_{D \text{ MBD2-Cu(I)}} = 8.89 \times 10^{-14} M$$

$$K_{D \text{ MBD3-Cu(I)}} = 1.08 \times 10^{-13} M$$

Circular dichroism spectroscopy

Prior to the measurement, proteins were buffer exchanged into CD buffer (10 mM KCl, 10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 7.2) using Zeba™ spin desalting columns (ThermoFisher Scientific) as described above and adjusted to a final concentration of 20 μM . Spectra were recorded from 190 nm to 320 nm on a Jasco J-815 spectropolarimeter (Jasco) at 20°C using a quartz glass cuvette with a path length of 1 mm. The scanning speed was 50 nm/min with a 1 nm bandwidth, the digital integration time (D.I.T) was 2 s and the step size was 0.1 or 1 nm. For each spectrum, eight measurements were accumulated. The BeStSel webserver (Micsonai *et al.*, 2022; Micsonai *et al.*, 2018; Micsonai *et al.*, 2015) was used to estimate secondary structure contents from the obtained spectra, considering wavelengths in the range from 190 nm to 250 nm.

Protein crystallization

For the crystallization of MBD3 of *A. thaliana* RAN1, aliquots of the protein purified by IMAC were thawed and further purified to homogeneity by SEC as described above. The purified protein was stored at 6-8°C overnight prior to crystallization. MBD3 was then crystallized using the sitting drop vapor diffusion method at 285.15 K (Hampel *et al.*, 1968). Crystals were grown from a mixture containing 0.1 μ l of protein solution (4.8 mg/ml protein, 50 mM HEPES pH 7.2, 300 mM NaCl) and 0.1 μ l of precipitant (100 mM MES pH 6.5, 200 mM NaCl, 10% (w/v) PEG 4000). Rod-shaped crystals of approximately 300 \times 20 μ m formed within 75 days. Mineral oil (Sigma Aldrich, M3516) was applied to the crystallization drops before harvesting to prevent evaporation during handling and to serve as a cryo-protectant. The crystals were then harvested using lithographic loops (Dual Thickness MicroLoops LD, MiTeGen) and flash-cooled in liquid nitrogen. The X-ray diffraction data were collected at 100 K and a wavelength of 0.8856 Å at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) beamline ID23-1 using an Eiger2 16M detector (Dectris). To minimize radiation damage, a helical data collection protocol was applied with an oscillation range of 0.1° per image, resulting in a dataset of 3600 images for a total oscillation width of 360°.

Data reduction, integration, and scaling were performed using the program DIALS (Winter *et al.*, 2018). Based on data processing statistics and manual inspection of diffraction images, a subset of 1900 images (images 1250 to 3150) was used for final data processing. However, only 65% of all reflections were successfully indexed by DIALS when allowed to search for multiple lattices. This resulted in two distinct lattices, which were subsequently merged due to virtually identical unit cell parameters. The resolution cutoff was initially determined using a threshold for $CC_{1/2}$ of 0.3 leading to a high-resolution cutoff of 1.78 Å. Due to low data completeness within the high-resolution shells caused by the chosen detector distance during data collection, this was eventually lowered to 1.98 Å.

Initial phases were obtained from molecular replacement (MR) using the AlphaFold2 (Jumper *et al.*, 2021; Varadi *et al.*, 2022) prediction of RAN1 as a template (AlphaFold DB: Q9S7J8). The model was cut to the boundaries of MBD3, and pLDDTs were converted to B-factors using tools provided by the PHENIX (Liebschner *et al.*, 2019; Terwilliger *et al.*, 2023; Terwilliger *et al.*, 2022) software package before usage as a search model in PHASER (McCoy *et al.*, 2007). The initial MR solution was used for automated model rebuilding using BUCCANEER (Cowtan, 2006) from the CCP4 software suite (Winn *et al.*, 2011). The resulting model was then subjected to iterative manual model rebuilding using COOT (Emsley *et al.*, 2010). Each iteration of manual rebuilding was followed by crystallographic refinement using PHENIX.refine (Afonine *et al.*, 2012). Data collection and refinement statistics are summarized in Table S1.

All figures in this study were prepared with PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.5 Schrödinger, LLC).

Data availability

The atomic coordinates and structure factors were deposited in the Protein Data Bank (PDB, www.pdb.org) under the accession code 8RNZ (DOI: 10.2210/pdb8rnz/pdb). Raw diffraction image data were deposited in the Zenodo repository (DOI: 10.5281/zenodo.10479001).

Funding

This work was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) project no. 267205415 / CRC 1208 grant to GG (TP B06) and HG (TP A03).

Author contributions

G.G., D.D., H.G., and L.S.K conceived the project, D.D. and G.G designed and analyzed wet-lab experiments, L.S.K., S.S-V., and H.G. designed and analyzed computational experiments. D.D. performed wet-lab experiments, A.M. evaluated crystallographic data, L.S.K. and S.S-V. performed computational experiments. G.G. and H.G. secured funding and provided resources. All authors wrote and structured the manuscript.

Acknowledgements

We are grateful for computational support and infrastructure provided by the “Zentrum für Informations- und Medientechnologie” (ZIM) at the Heinrich Heine University Düsseldorf and the computing time provided by the John von Neumann Institute for Computing (NIC) to HG on the supercomputer JUWELS at Jülich Supercomputing Centre (JSC) (user ID: VSK33, ETR1). We acknowledge the Center for Structural Studies (CSS) at the Heinrich Heine University Düsseldorf for assisting in screening protein crystallization conditions. The Center for Structural Studies is funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG Grant number 417919780). Further, we acknowledge the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) for provision of synchrotron radiation facilities under proposal number MX2485, and we would like to thank Alexander Popov for his assistance and support in using beamline ID23-1.

Declaration of interests

The authors declare no competing interests.

References

2023-2, S.R. (2023). Maestro-Schrödinger.

Abramson, J., Adler, J., Dunger, J., Evans, R., Green, T., Pritzel, A., Ronneberger, O., Willmore, L., Ballard, A.J., Bambrick, J., et al. (2024). Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature* 10.1038/s41586-024-07487-w.

Afonine, P.V., Grosse-Kunstleve, R.W., Echols, N., Headd, J.J., Moriarty, N.W., Mustyakimov, M., Terwilliger, T.C., Urzhumtsev, A., Zwart, P.H., and Adams, P.D. (2012). Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **68**:352-367. 10.1107/S0907444912001308.

Anastassopoulou, I., Banci, L., Bertini, I., Cantini, F., Katsari, E., and Rosato, A. (2004). Solution structure of the apo and copper(I)-loaded human metallochaperone HAH1. *Biochemistry* **43**:13046-13053. 10.1021/bi0487591.

Andres-Colas, N., Sancenon, V., Rodriguez-Navarro, S., Mayo, S., Thiele, D.J., Ecker, J.R., Puig, S., and Penarrubia, L. (2006). The Arabidopsis heavy metal P-type ATPase HMA5 interacts with metallochaperones and functions in copper detoxification of roots. *Plant J.* **45**:225-236. 10.1111/j.1365-313X.2005.02601.x.

Arnesano, F., Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Molteni, E., Huffman, D.L., and O'Halloran, T.V. (2002). Metallochaperones and metal-transporting ATPases: a comparative analysis of sequences and structures. *Genome Res.* **12**:255-271. 10.1101/gr.196802.

Banci, L., Bertini, I., Del Conte, R., Markey, J., and Ruiz-Duenas, F.J. (2001). Copper trafficking: the solution structure of *Bacillus subtilis* CopZ. *Biochemistry* **40**:15660-15668. 10.1021/bi0112715.

Banci, L., Bertini, I., Chasapis, C.T., Rosato, A., and Tenori, L. (2007). Interaction of the two soluble metal-binding domains of yeast Ccc2 with copper(I)-Atx1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **364**:645-649. 10.1016/j.bbrc.2007.10.045.

Banci, L., Bertini, I., Cantini, F., Felli, I.C., Gonnelli, L., Hadjiliadis, N., Pierattelli, R., Rosato, A., and Voulgaris, P. (2006). The Atx1-Ccc2 complex is a metal-mediated protein-protein interaction. *Nat Chem Biol* **2**:367-368. 10.1038/nchembio797.

Binder, B.M., Rodriguez, F.I., Bleecker, A.B., and Patterson, S.E. (2007). The effects of Group 11 transition metals, including gold, on ethylene binding to the ETR1 receptor and growth of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **581**:5105-5109. 10.1016/j.febslet.2007.09.057.

Bitter, R.M., Oh, S., Deng, Z., Rahman, S., Hite, R.K., and Yuan, P. (2022). Structure of the Wilson disease copper transporter ATP7B. *Sci Adv* **8**:eabl5508. 10.1126/sciadv.abl5508.

Brewer, G.J. (2010). Copper toxicity in the general population. *Clin Neurophysiol* **121**:459-460. 10.1016/j.clinph.2009.12.015.

Chen, Y.F., Randlett, M.D., Findell, J.L., and Schaller, G.E. (2002). Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **277**:19861-19866. 10.1074/jbc.M201286200.

Cheng, Y., and Prusoff, W.H. (1973). Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **22**:3099-3108. 10.1016/0006-2952(73)90196-2.

Consortium, T.U. (2021). UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res.* **49**:D480-D489. 10.1093/nar/gkaa1100.

Cowtan, K. (2006). The Buccaneer software for automated model building. 1. Tracing protein chains. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **62**:1002-1011. 10.1107/S0907444906022116.

- del Pozo, T., Cambiazo, V., and Gonzalez, M.** (2010). Gene expression profiling analysis of copper homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **393**:248-252. 10.1016/j.bbrc.2010.01.111.
- Dluhosch, D., Kersten, L.S., Schott-Verdugo, S., Hoppen, C., Schwarten, M., Willbold, D., Gohlke, H., and Groth, G.** (2024). Structure and dimerization properties of the plant-specific copper chaperone CCH. *Sci Rep* **14**:19099. 10.1038/s41598-024-69532-y.
- Dominguez, C., Boelens, R., and Bonvin, A.M.** (2003). HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *J. Am. Chem. Soc.* **125**:1731-1737. 10.1021/ja026939x.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., and Cowtan, K.** (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**:486-501. 10.1107/S0907444910007493.
- Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M.A., Madhusudhan, M.S., Eramian, D., Shen, M.Y., Pieper, U., and Sali, A.** (2006). Comparative protein structure modeling using Modeller. *Curr Protoc Bioinformatics Chapter 5*:Unit-5 6. 10.1002/0471250953.bi0506s15.
- Festa, R.A., and Thiele, D.J.** (2011). Copper: an essential metal in biology. *Curr. Biol.* **21**:R877-883. 10.1016/j.cub.2011.09.040.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S.e., Wilkins, M.R., Appel, R.D., and Bairoch, A.** (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In *The Proteomics Protocols Handbook*, J.M. Walker, ed. (Humana Press: Totowa, NJ), pp. 571-607. 10.1385/1-59259-890-0:571.
- Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A., 3rd, and Smith, H.O.** (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* **6**:343-345. 10.1038/nmeth.1318.
- Gill, S.S., and Tuteja, N.** (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* **48**:909-930. 10.1016/j.plaphy.2010.08.016.
- Gitschier, J., Moffat, B., Reilly, D., Wood, W.I., and Fairbrother, W.J.** (1998). Solution structure of the fourth metal-binding domain from the Menkes copper-transporting ATPase. *Nat. Struct. Biol.* **5**:47-54. 10.1038/nsb0198-47.
- Gonzalez-Guerrero, M., and Arguello, J.M.** (2008). Mechanism of Cu⁺-transporting ATPases: soluble Cu⁺ chaperones directly transfer Cu⁺ to transmembrane transport sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:5992-5997. 10.1073/pnas.0711446105.
- Greenfield, N., and Fasman, G.D.** (1969). Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry* **8**:4108-4116. 10.1021/bi00838a031.
- Guo, Z., Oradd, F., Bagenholm, V., Gronberg, C., Ma, J.F., Ott, P., Wang, Y., Andersson, M., Pedersen, P.A., Wang, K., et al.** (2024). Diverse roles of the metal binding domains and transport mechanism of copper transporting P-type ATPases. *Nat Commun* **15**:2690. 10.1038/s41467-024-47001-4.
- Hampel, A., Labanauskas, M., Connors, P.G., Kirkegard, L., RajBhandary, U.L., Sigler, P.B., and Bock, R.M.** (1968). Single crystals of transfer RNA from formylmethionine and phenylalanine transfer RNA's. *Science* **162**:1384-1387. 10.1126/science.162.3860.1384.
- Hamza, I., Schaefer, M., Klomp, L.W., and Gitlin, J.D.** (1999). Interaction of the copper chaperone HAH1 with the Wilson disease protein is essential for copper homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:13363-13368. 10.1073/pnas.96.23.13363.
- Harrison, M.D., Jones, C.E., and Dameron, C.T.** (1999). Copper chaperones: function, structure and copper-binding properties. *J. Biol. Inorg. Chem.* **4**:145-153. 10.1007/s007750050297.

- Harrison, M.D., Jones, C.E., Solioz, M., and Dameron, C.T.** (2000). Intracellular copper routing: the role of copper chaperones. *Trends Biochem. Sci.* **25**:29-32. 10.1016/s0968-0004(99)01492-9.
- Heaton, D., Nittis, T., Srinivasan, C., and Winge, D.R.** (2000). Mutational analysis of the mitochondrial copper metallochaperone Cox17. *J. Biol. Chem.* **275**:37582-37587. 10.1074/jbc.M006639200.
- Himelblau, E., Mira, H., Lin, S.J., Culotta, V.C., Penarrubia, L., and Amasino, R.M.** (1998). Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene ATX1 from Arabidopsis. *Plant Physiol.* **117**:1227-1234. 10.1104/pp.117.4.1227.
- Hirayama, T., Kieber, J.J., Hirayama, N., Kogan, M., Guzman, P., Nourizadeh, S., Alonso, J.M., Dailey, W.P., Dancis, A., and Ecker, J.R.** (1999). RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in Arabidopsis. *Cell* **97**:383-393. 10.1016/s0092-8674(00)80747-3.
- Holzwarth, G., and Doty, P.** (1965). The Ultraviolet Circular Dichroism of Polypeptides. *J. Am. Chem. Soc.* **87**:218-228. 10.1021/ja01080a015.
- Hoppen, C., Muller, L., Hansch, S., Uzun, B., Milic, D., Meyer, A.J., Weidtkamp-Peters, S., and Groth, G.** (2019). Soluble and membrane-bound protein carrier mediate direct copper transport to the ethylene receptor family. *Sci Rep* **9**:10715. 10.1038/s41598-019-47185-6.
- Huffman, D.L., and O'Halloran, T.V.** (2000). Energetics of copper trafficking between the Atx1 metallochaperone and the intracellular copper transporter, Ccc2. *J. Biol. Chem.* **275**:18611-18614. 10.1074/jbc.C000172200.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Zidek, A., Potapenko, A., et al.** (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**:583-589. 10.1038/s41586-021-03819-2.
- Kanonenberg, K., Smits, S.H.J., and Schmitt, L.** (2019). Functional Reconstitution of HlyB, a Type I Secretion ABC Transporter, in Saposin-A Nanoparticles. *Sci Rep* **9**:8436. 10.1038/s41598-019-44812-0.
- Kehrer, J.P.** (2000). The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* **149**:43-50. 10.1016/s0300-483x(00)00231-6.
- Keller, A.M., Benitez, J.J., Klarin, D., Zhong, L., Goldfogel, M., Yang, F., Chen, T.Y., and Chen, P.** (2012). Dynamic multibody protein interactions suggest versatile pathways for copper trafficking. *J. Am. Chem. Soc.* **134**:8934-8943. 10.1021/ja3018835.
- Kumar, V., Pandita, S., Singh Sidhu, G.P., Sharma, A., Khanna, K., Kaur, P., Bali, A.S., and Setia, R.** (2021). Copper bioavailability, uptake, toxicity and tolerance in plants: A comprehensive review. *Chemosphere* **262**:127810. 10.1016/j.chemosphere.2020.127810.
- Levy, A.R., Turgeman, M., Gevorkyan-Aiapetov, L., and Ruthstein, S.** (2017). The structural flexibility of the human copper chaperone Atox1: Insights from combined pulsed EPR studies and computations. *Protein Sci.* **26**:1609-1618. 10.1002/pro.3197.
- Liebschner, D., Afonine, P.V., Baker, M.L., Bunkoczi, G., Chen, V.B., Croll, T.I., Hintze, B., Hung, L.W., Jain, S., McCoy, A.J., et al.** (2019). Macromolecular structure determination using X-rays, neutrons and electrons: recent developments in Phenix. *Acta Crystallogr D Struct Biol* **75**:861-877. 10.1107/S2059798319011471.
- Lomize, A.L., Todd, S.C., and Pogozeva, I.D.** (2022). Spatial arrangement of proteins in planar and curved membranes by PPM 3.0. *Protein Sci* **31**:209-220. 10.1002/pro.4219.
- Madeira, F., Pearce, M., Tivey, A.R.N., Basutkar, P., Lee, J., Edbali, O., Madhusoodanan, N., Kolesnikov, A., and Lopez, R.** (2022). Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. *Nucleic Acids Res.* **50**:W276-W279. 10.1093/nar/gkac240.

- McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., and Read, R.J.** (2007). Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40**:658-674. 10.1107/S0021889807021206.
- Micsonai, A., Wien, F., Kernya, L., Lee, Y.H., Goto, Y., Refregiers, M., and Kardos, J.** (2015). Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**:E3095-3103. 10.1073/pnas.1500851112.
- Micsonai, A., Wien, F., Bulyaki, E., Kun, J., Moussong, E., Lee, Y.H., Goto, Y., Refregiers, M., and Kardos, J.** (2018). BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra. *Nucleic Acids Res.* **46**:W315-W322. 10.1093/nar/gky497.
- Micsonai, A., Moussong, E., Wien, F., Boros, E., Vadaszi, H., Murvai, N., Lee, Y.H., Molnar, T., Refregiers, M., Goto, Y., et al.** (2022). BeStSel: webserver for secondary structure and fold prediction for protein CD spectroscopy. *Nucleic Acids Res.* **50**:W90-W98. 10.1093/nar/gkac345.
- Milic, D., Dick, M., Mulnaes, D., Pflieger, C., Kinnen, A., Gohlke, H., and Groth, G.** (2018). Recognition motif and mechanism of ripening inhibitory peptides in plant hormone receptor ETR1. *Sci Rep* **8**:3890. 10.1038/s41598-018-21952-3.
- Mir, A.R., Pichtel, J., and Hayat, S.** (2021). Copper: uptake, toxicity and tolerance in plants and management of Cu-contaminated soil. *BioMetals* **34**:737-759. 10.1007/s10534-021-00306-z.
- Mira, H., Martinez-Garcia, F., and Penarrubia, L.** (2001). Evidence for the plant-specific intercellular transport of the Arabidopsis copper chaperone CCH. *Plant J.* **25**:521-528. 10.1046/j.1365-313x.2001.00985.x.
- Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S., and Steinegger, M.** (2021). ColabFold - Making protein folding accessible to all. 10.1101/2021.08.15.456425.
- Mulnaes, D., Koenig, F., and Gohlke, H.** (2021a). TopSuite Web Server: A Meta-Suite for Deep-Learning-Based Protein Structure and Quality Prediction. *J. Chem. Inf. Model.* **61**:548-553. 10.1021/acs.jcim.0c01202.
- Mulnaes, D., Golchin, P., Koenig, F., and Gohlke, H.** (2021b). TopDomain: Exhaustive Protein Domain Boundary Metaprediction Combining Multisource Information and Deep Learning. *J Chem Theory Comput* **17**:4599-4613. 10.1021/acs.jctc.1c00129.
- Olsson, M.H., Søndergaard, C.R., Rostkowski, M., and Jensen, J.H.** (2011). PROPKA3: consistent treatment of internal and surface residues in empirical pK_a predictions. *J. Chem. Theory Comput.* **7**:525-537.
- Padilla-Benavides, T., McCann, C.J., and Arguello, J.M.** (2013). The mechanism of Cu⁺ transport ATPases: interaction with Cu⁺ chaperones and the role of transient metal-binding sites. *J. Biol. Chem.* **288**:69-78. 10.1074/jbc.M112.420810.
- Pavlin, M., Qasem, Z., Sameach, H., Gevorkyan-Airapetov, L., Ritacco, I., Ruthstein, S., and Magistrato, A.** (2019). Unraveling the Impact of Cysteine-to-Serine Mutations on the Structural and Functional Properties of Cu(I)-Binding Proteins. *Int J Mol Sci* **20**10.3390/ijms20143462.
- Perkal, O., Qasem, Z., Turgeman, M., Schwartz, R., Gevorkyan-Airapetov, L., Pavlin, M., Magistrato, A., Major, D.T., and Ruthstein, S.** (2020). Cu(I) Controls Conformational States in Human Atox1 Metallochaperone: An EPR and Multiscale Simulation Study. *J. Phys. Chem. B* **124**:4399-4411. 10.1021/acs.jpcc.0c01744.
- Pirrung, M.C., Bleecker, A.B., Inoue, Y., Rodriguez, F.I., Sugawara, N., Wada, T., Zou, Y., and Binder, B.M.** (2008). Ethylene receptor antagonists: strained alkenes are necessary but not sufficient. *Chem. Biol.* **15**:313-321. 10.1016/j.chembiol.2008.02.018.

- Pufahl, R.A., Singer, C.P., Peariso, K.L., Lin, S.J., Schmidt, P.J., Fahrni, C.J., Culotta, V.C., Penner-Hahn, J.E., and O'Halloran, T.V.** (1997). Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor Atx1. *Science* **278**:853-856. 10.1126/science.278.5339.853.
- Puig, S., Lee, J., Lau, M., and Thiele, D.J.** (2002). Biochemical and genetic analyses of yeast and human high affinity copper transporters suggest a conserved mechanism for copper uptake. *J. Biol. Chem.* **277**:26021-26030. 10.1074/jbc.M202547200.
- Puig, S., Mira, H., Dorcey, E., Sancenon, V., Andres-Colas, N., Garcia-Molina, A., Burkhead, J.L., Gogolin, K.A., Abdel-Ghany, S.E., Thiele, D.J., et al.** (2007). Higher plants possess two different types of ATX1-like copper chaperones. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **354**:385-390. 10.1016/j.bbrc.2006.12.215.
- Ren, F., Logeman, B.L., Zhang, X., Liu, Y., Thiele, D.J., and Yuan, P.** (2019). X-ray structures of the high-affinity copper transporter Ctr1. *Nat Commun* **10**:1386. 10.1038/s41467-019-09376-7.
- Rodriguez-Granillo, A., and Wittung-Stafshede, P.** (2008). Structure and dynamics of Cu(I) binding in copper chaperones Atox1 and CopZ: a computer simulation study. *J. Phys. Chem. B* **112**:4583-4593. 10.1021/jp711787x.
- Rodriguez, F.I., Esch, J.J., Hall, A.E., Binder, B.M., Schaller, G.E., and Bleecker, A.B.** (1999). A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from Arabidopsis. *Science* **283**:996-998.
- Rosenzweig, A.C., Huffman, D.L., Hou, M.Y., Wernimont, A.K., Pufahl, R.A., and O'Halloran, T.V.** (1999a). Crystal structure of the Atx1 metallochaperone protein at 1.02 Å resolution. *Structure* **7**:605-617. 10.1016/s0969-2126(99)80082-3.
- Rosenzweig, A.C., Huffman, D.L., Hou, M.Y., Wernimont, A.K., Pufahl, R.A., and O'Halloran, T.V.** (1999b). Crystal structure of the Atx1 metallochaperone protein at 1.02 Å resolution. *Structure* **7**:605-617. 10.1016/s0969-2126(99)80082-3.
- Rubino, J.T., and Franz, K.J.** (2012). Coordination chemistry of copper proteins: how nature handles a toxic cargo for essential function. *J. Inorg. Biochem.* **107**:129-143. 10.1016/j.jinorgbio.2011.11.024.
- Schaller, G.E., Ladd, A.N., Lanahan, M.B., Spanbauer, J.M., and Bleecker, A.B.** (1995). The ethylene response mediator ETR1 from Arabidopsis forms a disulfide-linked dimer. *J. Biol. Chem.* **270**:12526-12530.
- Schott-Verdugo, S., Muller, L., Classen, E., Gohlke, H., and Groth, G.** (2019). Structural Model of the ETR1 Ethylene Receptor Transmembrane Sensor Domain. *Sci Rep* **9**:8869. 10.1038/s41598-019-45189-w.
- Shabbir, Z., Sardar, A., Shabbir, A., Abbas, G., Shamshad, S., Khalid, S., Natasha, Murtaza, G., Dumat, C., and Shahid, M.** (2020). Copper uptake, essentiality, toxicity, detoxification and risk assessment in soil-plant environment. *Chemosphere* **259**:127436. 10.1016/j.chemosphere.2020.127436.
- Stasser, J.P., Eisses, J.F., Barry, A.N., Kaplan, J.H., and Blackburn, N.J.** (2005). Cysteine-to-serine mutants of the human copper chaperone for superoxide dismutase reveal a copper cluster at a domain III dimer interface. *Biochemistry* **44**:3143-3152. 10.1021/bi0478392.
- Terwilliger, T.C., Poon, B.K., Afonine, P.V., Schlicksup, C.J., Croll, T.I., Millan, C., Richardson, J.S., Read, R.J., and Adams, P.D.** (2022). Improved AlphaFold modeling with implicit experimental information. *Nat. Methods* **19**:1376-1382. 10.1038/s41592-022-01645-6.
- Terwilliger, T.C., Afonine, P.V., Liebschner, D., Croll, T.I., McCoy, A.J., Oeffner, R.D., Williams, C.J., Poon, B.K., Richardson, J.S., Read, R.J., et al.** (2023). Accelerating crystal structure determination with iterative AlphaFold prediction. *Acta Crystallogr D Struct Biol* **79**:234-244. 10.1107/S205979832300102X.

- Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., et al.** (2022). AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res.* **50**:D439-D444. 10.1093/nar/gkab1061.
- Venyaminov, S., Baikalov, I.A., Shen, Z.M., Wu, C.S., and Yang, J.T.** (1993). Circular dichroic analysis of denatured proteins: inclusion of denatured proteins in the reference set. *Anal. Biochem.* **214**:17-24. 10.1006/abio.1993.1450.
- Walker, J.M., Tsivkovskii, R., and Lutsenko, S.** (2002). Metallochaperone Atox1 transfers copper to the NH₂-terminal domain of the Wilson's disease protein and regulates its catalytic activity. *J. Biol. Chem.* **277**:27953-27959. 10.1074/jbc.M203845200.
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M., Clamp, M., and Barton, G.J.** (2009). Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* **25**:1189-1191. 10.1093/bioinformatics/btp033.
- Wernimont, A.K., Huffman, D.L., Lamb, A.L., O'Halloran, T.V., and Rosenzweig, A.C.** (2000). Structural basis for copper transfer by the metallochaperone for the Menkes/Wilson disease proteins. *Nat. Struct. Biol.* **7**:766-771. 10.1038/78999.
- Winn, M.D., Ballard, C.C., Cowtan, K.D., Dodson, E.J., Emsley, P., Evans, P.R., Keegan, R.M., Krissinel, E.B., Leslie, A.G., McCoy, A., et al.** (2011). Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **67**:235-242. 10.1107/S0907444910045749.
- Winter, G., Waterman, D.G., Parkhurst, J.M., Brewster, A.S., Gildea, R.J., Gerstel, M., Fuentes-Montero, L., Vollmar, M., Michels-Clark, T., Young, I.D., et al.** (2018). DIALS: implementation and evaluation of a new integration package. *Acta Crystallogr D Struct Biol* **74**:85-97. 10.1107/S2059798317017235.
- Xiao, Z., Donnelly, P.S., Zimmermann, M., and Wedd, A.G.** (2008). Transfer of copper between bis(thiosemicarbazone) ligands and intracellular copper-binding proteins. insights into mechanisms of copper uptake and hypoxia selectivity. *Inorg. Chem.* **47**:4338-4347. 10.1021/ic702440e.
- Xiao, Z., Brose, J., Schimo, S., Ackland, S.M., La Fontaine, S., and Wedd, A.G.** (2011). Unification of the copper(I) binding affinities of the metallo-chaperones Atx1, Atox1, and related proteins: detection probes and affinity standards. *J. Biol. Chem.* **286**:11047-11055. 10.1074/jbc.M110.213074.
- Xie, Z., and Xu, J.** (2022). Deep graph learning of inter-protein contacts. *Bioinformatics* **38**:947-953. 10.1093/bioinformatics/btab761.
- Yatsunyk, L.A., and Rosenzweig, A.C.** (2007). Cu(I) binding and transfer by the N terminus of the Wilson disease protein. *J. Biol. Chem.* **282**:8622-8631. 10.1074/jbc.M609533200.
- Zeinert, R., Zhou, F., Franco, P., Zoller, J., Lessen, H.J., Aravind, L., Langer, J.D., Sodt, A.J., Storz, G., and Matthies, D.** (2024). Magnesium Transporter MgtA revealed as a Dimeric P-type ATPase. *bioRxiv* 10.1101/2024.02.28.582502.
- Zhang, Y., Chen, K., Zhao, F.J., Sun, C., Jin, C., Shi, Y., Sun, Y., Li, Y., Yang, M., Jing, X., et al.** (2018). OsATX1 Interacts with Heavy Metal P1B-Type ATPases and Affects Copper Transport and Distribution. *Plant Physiol.* **178**:329-344. 10.1104/pp.18.00425.
- Zimmermann, M., Clarke, O., Gulbis, J.M., Keizer, D.W., Jarvis, R.S., Cobbett, C.S., Hinds, M.G., Xiao, Z., and Wedd, A.G.** (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**:11640-11654. 10.1021/bi901573b.

Supplemental Information

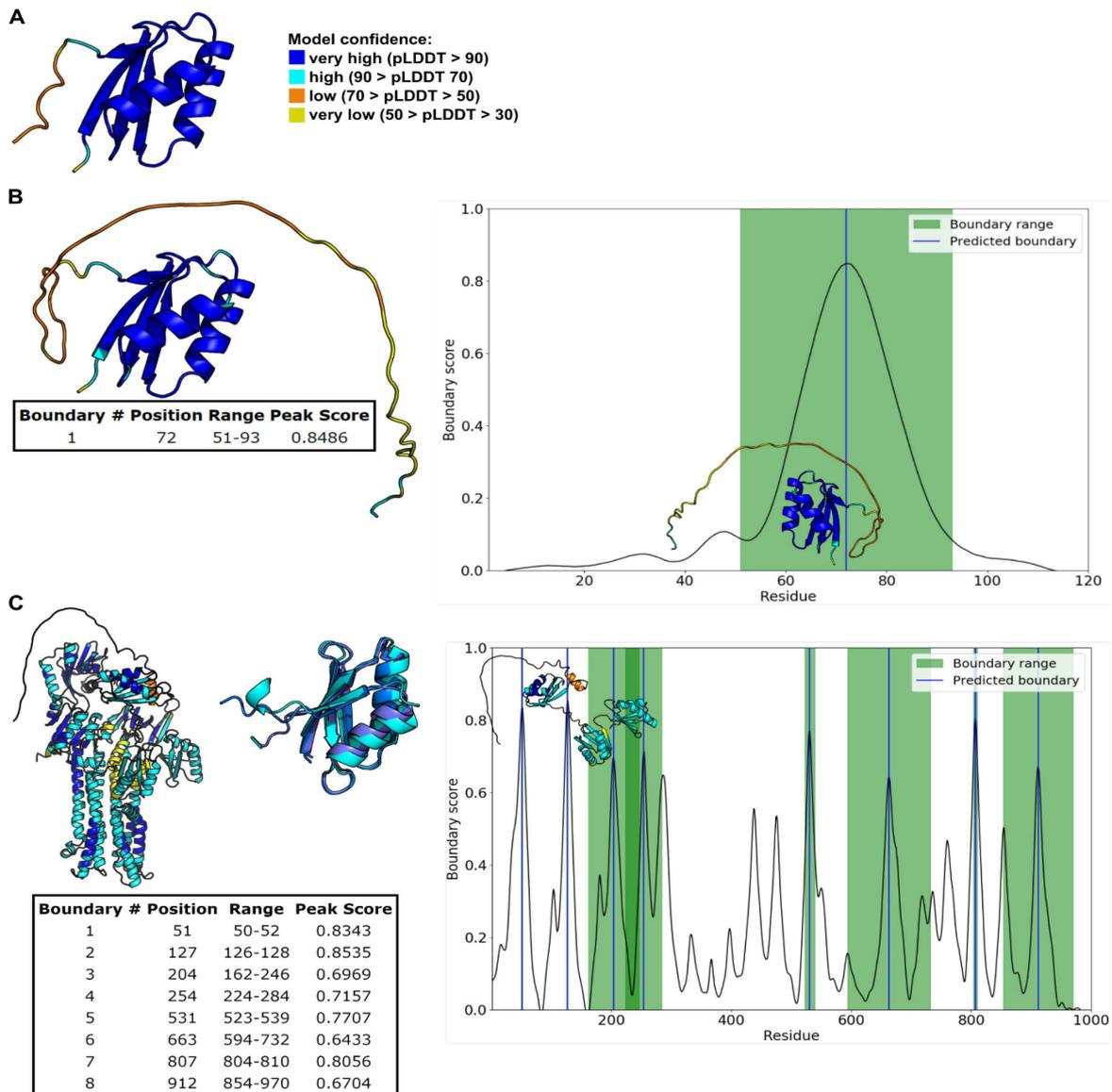


Figure S1: Characterization of boundaries in CCH and RAN1 using AlphaFold2 and TopDomain. A: Representation of the structural model of ATX1 generated with AlphaFold. Colors correspond to the pLDDT, with dark blue indicating pLDDT > 90. The model has the ATX1-like fold. Residues in secondary structure elements have high pLDDT values. **B:** Representation of the structural model of CCH generated with AlphaFold. Colors correspond to the pLDDT. The model has the ATX1-like fold and residues located in secondary structure elements have high pLDDT values. The pLDDT values begin to fall from residue 69. TopDomain predicts a boundary between residues 51-93, with the highest boundary score at residues 52-93. For CCH to be comparable to ATX1, the boundary to the unstructured domain was set at residue 76. **C:** Representation of the structural model of RAN1 generated by AlphaFold. Colors correspond to the pLDDT. The structure has ATX1-like folds at the N-terminus. Sequence parts with these folds have pLDDT > 70 and are linked by loops with lower pLDDT values. The transmembrane domains and topological domains have pLDDT values of 70-90. TopDomain predicts boundaries between residues 50 to 53, 126 to 128, 162 to 246, and 224 to 284. Since residue 54 still has a pLDDT < 70, the beginning of MBD1 was set to 55. The end of MBD1 was set to 130 to include the ATX1-like fold and also some of the residues with lower pLDDT as in the case of ATX1 and CCH. MBD2 starts with the first residue involved in the

second ATX1-like fold according to the AlphaFold model and ends with residue 207, to include additionally some of the residues featuring a lower pLDDT as in the case of MBD1. MBD3 starts with residue 205, as the linker between MBD2 and MBD3 is only four residues long, and ends with residue 283 to include additionally some of the following residues.

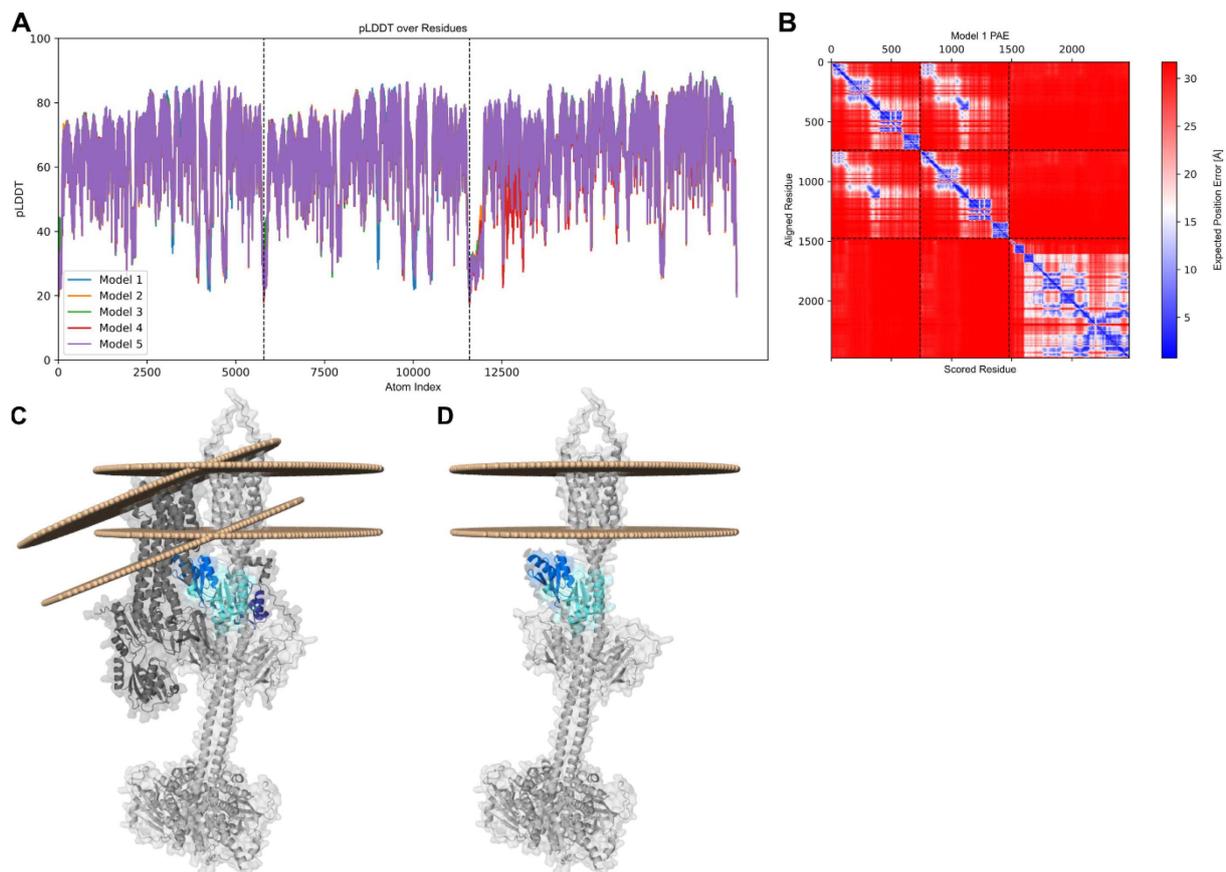


Figure S2: RAN1/ETR1 complex predicted by AlphaFold3. Visual inspection suggests that models 1 to 3 are somewhat structurally related (RMSD < 10 Å) and similar to the complexes created by protein-protein docking (Figure 5). In rank1-3, all MBDs feature distances of less than 5 Å to ETR1, where MBD1 is located on the opposite side of ETR1 as MBD2 and 3. **A:** pLDDT of the corresponding models. **B:** Predicted alignment error of model 1, also representative of models 2 and 3. **C:** Membrane orientation of RAN1 and ETR1. The TMDs of RAN1 and ETR1 would not be located in the same membrane. **D:** Predicted binding positions of MBD2 and MBD3 of RAN1. MBD2 and MBD3 bind to the same domains as in the docking approaches. The remaining domains of RAN1 are hidden for the sake of clarity.

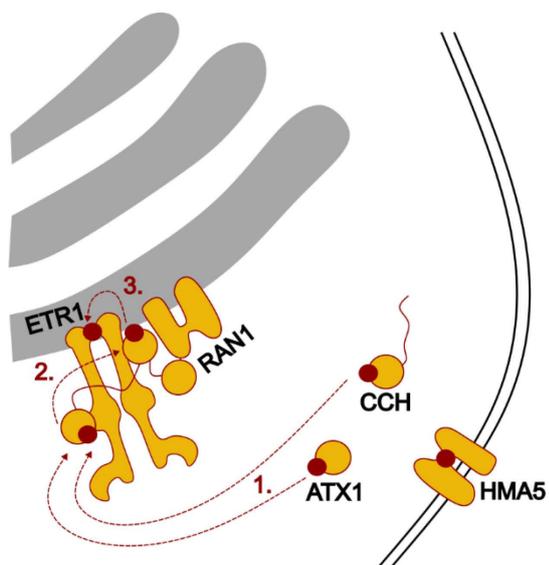


Figure S3: Schematic representation of the copper relay hypothesis. MBD1 accepts the copper from the soluble copper chaperones ATX1 and CCH and transfers the copper to MBD2. Due to MBD2's proximity to the ETR1 TMD, MBD2 finally transfers the copper to ETR1. MBD3 acts as an anchor stabilizing the ETR1/RAN1 complex.

Table S1: Data collection and refinement statistics. Statistics for the highest-resolution shell are shown in parentheses.

MBD3 (PDB-ID: 8RNZ)	
Data collection	
Wavelength (Å)	0.8856
Resolution range (Å)	51.48 – 1.98 (2.08 – 1.98)
Space group	P2 ₁ 22 ₁
Unit cell	
a, b, c (Å)	50.755, 51.481, 62.722
α, β, γ (°)	90, 90, 90
Total reflections	80517 (11847)
Unique reflections	11943 (1670)
Multiplicity	6.7 (7.1)
Completeness (%)	99.80 (99.24)
Mean I/σ ₁	5.81 (0.74)
Wilson B-factor	34.35
R _{merge}	0.1204 (0.5585)
R _{meas}	0.1306 (0.6044)
R _{pim}	0.04984 (0.2279)
CC _{1/2}	0.996 (0.836)
CC*	0.999 (0.954)
Model and refinement	
Reflections used in refinement	11941 (1668)
Reflections used for R _{free}	568 (69)
R _{work}	0.1922 (0.3236)
R _{free}	0.2349 (0.3587)
Number of non-hydrogen atoms	1309
Macromolecules	1229
Ligands	0
Solvent	80
RMSD	
Bond lengths (Å)	0.003
Bond angles (°)	0.540
Ramachandran analysis	
Favored regions (%)	100
Allowed Regions (%)	0
Outliers (%)	0
Rotamer outliers (%)	0
Clashscore	0.81
Average B-Factor	43.42
Macromolecules	43.34
Solvent	44.75

Table S2: Secondary structure contents of MBDs 1 to 3 calculated from CD-spectra in the wavelength range from 190 nm to 250 nm. Secondary structure contents were estimated by the BeStSel webserver, with the secondary structure elements 3_{10} -helix, π -helix, bend, β -bridge, and loop/irregular regions being sorted into the category "others".

	Secondary structure content [%]				Spectral deviation
	α -helical	β -sheet	turn	others	NRMSD
MBD1	12.8	29.5	12.6	45.1	0.009
MBD2	8.8	32.4	13.6	45.2	0.010
MBD3	20.4	24.4	10.4	44.8	0.008

Table S3: Primers used for cloning of the metal binding domains (MBDs) 1 to 3 of RAN1 from *Arabidopsis thaliana*.

Primer	Sequence [5'-3']
ATXfld-1-F	<i>ctgtatttcagggattaaggaagattcaggtcggga</i>
ATXfld-1-R	<i>cggatcctcgagtattgtgtctgttcttcagcc</i>
ATXfld-2-F	<i>ctgtatttcagggaaactttggtgggcaatttac</i>
ATXfld-2-R	<i>cggatcctcgagtactatcctgctgattactctg</i>
ATXfld-3-F	<i>ctgtatttcagggacagcaggataagctgtttaag</i>
ATXfld-3-R	<i>cggatcctcgagttaataaggctcataacacgc</i>
pETEV16b-F	<i>taactcgaggatccggctg</i>
pTEV-R	<i>tccctgaaaatacagtttcatgg</i>

4 Diskussion

Der Ethylenrezeptor ETR1 und das pflanzenspezifische Kupferchaperon CCH sind bis heute in Bezug auf ihre Struktur nur wenig erforscht, jedoch ist eine Verbindung zwischen den Kupferchaperonen ATX1 und CCH sowie der membranständigen, Cu(I)-transportierenden P-Typ ATPase RAN1, welche zusammen an der Regulation der pflanzlichen Kupferhomöostase beteiligt sind, und dem Ethylenrezeptor ETR1 bekannt. Zu Beginn dieser Arbeit war jedoch nicht bekannt, ob die zusätzliche C-terminale Domäne von CCH auch im Volllängen-Protein intrinsisch ungeordnet ist, oder ob dies nur auf die isolierte Domäne zutrifft und welchen Einfluss diese Domäne auf das Kupferchaperon CCH hat. Ebenso existierten zwar zu Beginn dieser Arbeit erste Hinweise darauf, dass ETR1 direkt mit RAN1 interagiert, jedoch war nicht genau bekannt, welche Rolle dabei die einzelnen MBDs von RAN1 spielen und ob diese Interaktion tatsächlich einen Transfer von Cu(I)-Ionen von RAN1 auf ETR1 zulassen würde. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die C-terminale Domäne von CCH im Volllängen-Protein eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung des Proteins und dessen Dimerisierungsverhalten übernimmt, was für eine mögliche Funktion im Langstreckentransport von Kupfer in der Pflanze von Bedeutung ist. Zudem konnte ein Mechanismus für den Transfer von Cu(I)-Ionen von den Kupferchaperonen ATX1 und CCH bis auf ETR1 abgeleitet werden, in welchem der N-Terminus der P-Typ ATPase RAN1 von zentraler Bedeutung ist.

Die hier erhaltenen Ergebnisse liefern erste Einblicke in die molekularen Mechanismen der Bereitstellung von Kupfer für die Ethylenrezeptoren und können als Ausgangspunkt für zukünftige Experimente dienen, mittels welcher der hier vorgeschlagene Mechanismus einerseits überprüft und andererseits die Regulation der Ethylensignaltransduktion in Abhängigkeit von der Kupferhomöostase in Pflanzen weiter untersucht werden kann.

4.1 CCH enthält eine intrinsisch ungeordnete Domäne mit multiplen Funktionen

Im Zuge dieser Arbeit konnten zum ersten Mal durch eine Kombination von biochemischen und bioinformatischen Methoden, Eigenschaften und Einflüsse der C-terminalen Domäne des pflanzenspezifischen Kupferchaperons CCH auf das Volllängen-Protein analysiert werden. Diese Ergebnisse erweitern die bereits in der Literatur zur Verfügung stehenden Erkenntnisse, welche jedoch in der Vielzahl der Fälle aus Experimenten mit der isolierten Domäne oder abgeleiteten Peptidsequenzen gewonnen wurden [44, 63, 64]. Die C-terminale Domäne liegt sowohl im apo-, als auch Cu(I)-beladenem Volllängen-Protein ungefalteten (*intrinsically disordered*) vor und ist nicht an der Bindung von Cu(I)-Ionen beteiligt, wie mit Hilfe von NMR-Spektroskopie, Titrationsexperimenten, in welchen die Fähigkeit der Cu(I)-Bindung von CCH

mit der C-terminal verkürzten Deletionsmutante CCH Δ verglichen wurde, als teilweise auch aus auf Strukturvorhersagen basierenden *Docking*-Experimenten gezeigt werden konnte. Die NMR-Daten bestätigen experimentell, dass CCH aus zwei Domänen besteht, einer N-terminalen Domäne mit Ferredoxin-ähnlicher (ATX1-ähnlicher) Faltung und einer C-terminalen, ungeordneten Domäne bestehend aus ca. 40 Aminosäuren. Diese nimmt wie zuvor erwähnt, auch in Gegenwart von Cu(I)-Ionen keine Faltung an (Kapitel 3.1 *Figure 1-2*). Nur die N-terminale Domäne, welche das für ATX1-ähnliche Kupferchaperone charakteristische CxxC- Cu(I)-Bindungsmotiv enthält, bindet Cu(I)-Ionen. Dies wurde u.a. dadurch gezeigt, dass sich in NMR-Experimenten auch nur für diese Domäne Änderungen der Signalintensitäten nach Zugabe von Cu(I) feststellen lassen, für die C-terminale Domäne ist dies jedoch nicht der Fall (Kapitel 3.1 *Figure 2*). Dies wird ebenfalls durch die Titrationsexperimente, in welchen der chromogene Kupferkomplex Cu(I)-BCA₂ mit CCH und der Deletionsmutante CCH Δ titriert wurde, bestätigt (Kapitel 3.1 *Figure 7*). Für CCH wurde in der Literatur von einer Cu(I)-induzierten Dimerisierung berichtet, welche wahrscheinlich durch den C-Terminus vermittelt wird [185]. Dies wurde daraus gefolgert, dass ein ähnlicher Effekt nicht für CCH Δ und das eng verwandte ATX1 beobachtet wurde [185]. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass der C-Terminus nicht für diese Beobachtung verantwortlich ist, da, wie bereits zuvor erwähnt, Cu(I) keine Konformationsänderungen im C-Terminus auslöst und dieser zudem keine Cu(I)-Ionen bindet. Weitere Experimente, mit denen eine potentielle Interaktion des C-Terminus von CCH mit Cu(I)-Ionen analysiert werden könnte, stellen z.B. die Titration des Cu(I)-BCA₂ Komplexes mit dem isolierten C-Terminus bzw. eine CD-spektroskopische Analyse des isolierten C-Terminus in Gegenwart verschiedener Cu(I)-Konzentrationen dar. Diese Experimente könnten die hier gewonnenen Erkenntnisse erweitern, haben aber den Nachteil, dass sich die daraus resultierenden Ergebnisse nicht unbedingt auf das Vollängenprotein übertragen lassen. Um diese Nachteile zu vermeiden, könnten zunächst anhand der Deletionsmutante CCH Δ notwendige Mutationen identifiziert werden, um in der N-terminalen Domäne Cu(I)-Bindung vollständig zu inhibieren. Dazu zählt das Cu(I)-bindende CxxC-Motiv, jedoch sollten auch ggf. weitere Mutationen in Betracht gezogen werden, sofern eine Cu(I)-Bindung, wenn auch eine schwache Bindung, auch nach Mutation des CxxC-Motivs fortbesteht. Diese Mutationen müssten dann auf CCH übertragen und dieses anschließend mit einem geeigneten Cu(I)-Reagenz zwecks potentieller Beladung mit Cu(I), versetzt werden. Der Nachweis einer (potentiellen) Cu(I)-Bindung, welche dann auf den C-Terminus zurückzuführen wäre, könnte dann nach Entfernung des überschüssigen Cu(I)-Reagenz durch Massenspektrometrie, z.B. mit ICP-MS erfolgen.

Da der isolierte C-Terminus in der Lage ist durch ionische Wechselwirkungen mit sich selbst Amyloid-ähnliche Fibrillen auszubilden [63], wurde zunächst eine Funktion des C-Terminus in der Oligo- bzw. Dimerisierung vermutet. Zunächst überraschend war die Beobachtung, dass

nicht nur CCH, sondern auch CCH Δ Dimere bildet und der C-Terminus daher nicht notwendig für die Dimerisierung zu sein scheint. Für beide Proteine konnte weiterhin gezeigt werden, dass diese Dimerisierung jedoch nur stattfindet, wenn beide Monomere im Cu(I)-freien Zustand vorliegen oder ein Cu(I):Protein-Verhältnis von 1:2 vorliegt (Kapitel 3.1 *Figure 3*). Dies ist in Einklang mit der Kristallstruktur des humanen Homologs HAH1 (PDB-ID: 1FEE), in welcher beide Monomere über ein Cu(I)-Ion verbunden sind und das Cu(I)-Ion durch die jeweiligen CxxC-Motive komplexiert wird. Das auch Kupferchaperone wie ATX1, welche die zusätzliche C-terminale Domäne nicht enthalten, zudem mit den MBDs von P_{1B}-Typ ATPasen, welche ebenfalls ein Ferredoxin- bzw. ATX1-ähnliches Faltungsmotiv aufweisen, auf dieselbe Weise interagieren, unterstreicht erneut, dass der C-Terminus von CCH nicht essentiell für die Dimerisierung ist [44]. Eine mittels NMR-Spektroskopie bestimmte Struktur für einen solchen Komplex existiert ebenfalls (PDB-ID: 2GGP). Dennoch lassen sich geringe Unterschiede in der Dissoziationskonstante (K_D) bei der Dimerisierung feststellen (CCH (-Cu): 18 ± 6 nM, CCH Δ (-Cu): 57 ± 9 nM, CCH (Cu:Protein = 1:2): 78 ± 39 nM, CCH Δ (Cu:Protein = 1:2): 169 ± 51 nM). CCH weist tendenziell unter gleichen Bedingungen immer eine 2-3x höhere Affinität bzgl. der Dimerisierung auf, als CCH Δ (Kapitel 3.1 *Figure 3*). Dennoch bilden sowohl CCH als auch CCH Δ homodimere Komplexe mit hoher Affinität. Auffällig ist, dass die Affinität für die Dimerisierung im Cu(I)-beladenen Zustand bei einem Cu:Protein-Verhältnis von 1:2 (+Cu) um den Faktor 3-4 geringer, als im apo-Zustand (-Cu). Eine potentielle Funktion dieser verringerten Affinität könnte darin bestehen, dass die Cu(I)-beladenen Dimere zunächst dissoziieren müssen, um das Cu(I)-Ion vom Chaperon auf ein entsprechendes Zielprotein zu übertragen und diese Übertragung durch die geringere Dimerisierungsaffinität im Cu(I)-beladenen Zustand erleichtert wird. Die Bildung eines Cu(I)-beladenen Dimers könnte einer verbesserten Abschirmung des Cu(I)-Ions dienen, um dieses sicher innerhalb der Pflanze über größere Distanz zu transportieren. Zwar wurde zuvor von einem K_D -Wert von 6 μ M für die Cu(I)-abhängige Dimerisierung von HAH1 berichtet, jedoch erfolgte die Bestimmung des K_D -Werts mittels *Surface Plasmon Resonance* (SPR) [186], einer Technik welche die Immobilisierung eines Interaktionspartners auf einer Oberfläche erfordert, wodurch sterische Effekte und die Orientierung des immobilisierten Proteins neben weiteren Effekten wie z.B. der pH-Wert die Bestimmung des K_D -Werts beeinflussen.

Die höhere Dimerisierungsaffinität der Cu(I)-freien Chaperone könnte weiterhin dem Schutz des CxxC-Motivs vor z.B. Oxidation dienen, sodass freie bzw. erhöhte Cu(I)-Konzentrationen innerhalb der Pflanze schnell und effizient gepuffert werden können und die Bildung von schädlichen ROS minimiert wird. Dies wäre auch in Einklang mit dem vermuteten interzellulären Cu(I)-Transport durch CCH, da eine Oxidation des CxxC-Motivs bei einer Lokalisation von CCH im reduzierenden Cytoplasma erschwert wäre [187]. In Einklang mit der Idee eines doppelt-komplexierten Cu(I)-Ions durch zwei Chaperon-Monomere ist auch die die

Beobachtung, dass bei einem Cu:Protein-Verhältnis von 1:1 keine Dimerisierung mehr zu beobachten ist (Kapitel 3.1 *Figure 3*). Unter diesen Bedingungen ist eine Interaktion der Cu(I)-beladenen Chaperone durch sterische Effekte nicht möglich ist. Dies zeigt zudem erneut experimentell, dass die Dimerisierung von CCH nicht auf den C-Terminus zurückzuführen ist. Bei einer direkten Beteiligung des C-Terminus an der Dimerisierung hätte auch eine Dimerisierung bei einem Cu:Protein-Verhältnis von 1:1 beobachtet werden müssen. Um zusätzliche, experimentell ermittelte Hinweise auf eine potentiell Dimer-induzierende Funktion des C-Terminus zu erhalten, könnten die hier durchgeführten Interaktionsstudien erneut mit Fusionsproteinen durchgeführt werden, welche aus einem gut charakterisierten, monomeren Protein wie z.B. Lysozym bestehen, an welches der C-Terminus von CCH angefügt wurde. Wäre der C-Terminus direkt an der Dimerisierung von CCH beteiligt, wäre auch für die Fusionsproteine eine Dimerisierung zu erwarten bzw. würde das Ausbleiben einer Dimerisierung die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse unterstreichen. Es bleibt aber festzuhalten, dass die Fähigkeit von ATX1-ähnlichen Kupferchaperonen zur Dimerbildung stark von den experimentellen Bedingungen abhängig ist und ein Vergleich mit publizierten Daten und Beobachtungen dadurch erschwert wird [188-190]. In dieser Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass CCH mit hoher Affinität dimerisiert und dass die Dimerisierung unabhängig von der C-terminalen Domäne erfolgt. Diese hat jedoch aufgrund der höheren Affinität bzgl. einer Dimerbildung von CCH im Vergleich zu CCH Δ , einen stabilisierenden Effekt.

Da für CCH keine zellulären oder physiologisch relevanten Konzentrationen bekannt sind, wurden diese auf Basis von zur Verfügung stehenden Daten für SOD1 abgeschätzt. Dadurch ergab sich eine physiologische relevante Konzentration von CCH zwischen 10 – 1000 nM. Eine auf den K_D -Werten (-Cu) basierende Berechnung des als Monomer- bzw. Dimer-vorliegenden Anteils von CCH und CCH Δ in diesem Konzentrationsbereich ergab, dass die zusätzliche C-terminale Domäne von CCH den Anteil monomeren Proteins um 7 – 18% im Vergleich zu CCH Δ reduziert. Dies könnte erneut auf eine regulatorische Funktion des C-Terminus in der pflanzlichen Kupferhomöostase hindeuten. Auch gibt es in der Literatur deutliche Hinweise darauf, dass Prion-ähnliche, intrinsisch-ungeordnete Proteine (IDPs) unter bestimmten Bedingungen intrazelluläre, membranlose Kondensate bilden [191]. Ein ähnlicher Effekt wäre aufgrund seines Aufbaus auch für CCH denkbar, was ebenfalls auf eine regulatorische Funktion der C-terminalen Domäne von CCH hindeuten könnte.

Eine experimentell ermittelte Struktur von CCH steht leider nicht zu Verfügung, weshalb im Zuge dieser Arbeit Strukturvorhersagen, welche von der AG Gohlke der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf generiert wurden, für CCH und CCH Δ bzw. deren Dimere verwendet wurden, um weitere Informationen über den strukturellen Aufbau von CCH und den Einfluss

des C-Terminus zu erhalten. Basierend auf der vollständigen Sequenz für CCH konnte mittels ColabFold [192] zunächst jedoch nur die Struktur des CCH-Monomers mit hoher Genauigkeit, nicht aber die Struktur des CCH-Dimers vorhergesagt werden, in welcher die CxxC-Motive beider Monomere wie in bekannten Strukturen von Homologen aus Hefe (PDB-ID: 2GGP) und des Menschen (PDB-ID: 1FEE) gegenüberliegen. Dennoch zeigt auch die Strukturvorhersage für das CCH-Monomer, dass CCH aus zwei Domänen besteht, einer N-terminalen Domäne mit dem Ferredoxin- bzw. ATX1-ähnlichen Faltungsmotiv und einer ungeordneten, C-terminalen Domäne. Dies wird auch an dem hohen pLDDT-score für die N-terminale und einem geringen pLDDT-score für die C-terminale Domäne deutlich. In den Bereichen mit hohem pLDDT-score stehen mehr Sequenzinformationen zur Verfügung, als für die Bereiche mit niedrigem pLDDT-score, sodass die Struktur in Bereichen mit hohem pLDDT-score genauer vorhergesagt werden kann (Kapitel 3.1 *Figure S3 A-B*). Weitere computergestützte Analysen stimmen mit dem von ColabFold vorhergesagten Modell darin überein, dass CCH aus zwei Domänen besteht und der C-Terminus sehr wahrscheinlich ungeordnet vorliegt (Kapitel 3.1 *Figure S3 C-E*). Somit stimmt die vorhergesagte Struktur von CCH mit den hier erhaltenen experimentellen sowie den in der Literatur verfügbaren Daten zu CCH [64] überein. Weiterhin wurde daraus gefolgert, dass die erwartete Dimerstruktur von Vollängen-CCH aufgrund der fehlenden strukturellen Information des C-Terminus nicht vorhergesagt werden konnte, was dadurch bestätigt wurde, dass eine zu den PDB-IDs 1FEE und 2GGP- analoge Struktur des Dimers für CCH Δ mit hoher Genauigkeit vorhergesagt werden konnte (Kapitel 3.1 *Figure S4-S5*). Die Qualität/ Verlässlichkeit der Strukturvorhersage innerhalb der Monomere ist an den hohen pLDDT-scores, die Genauigkeit/Verlässlichkeit der relativen Anordnung der Domänen bzw. Monomere ist am geringen PAE erkennbar. Um dennoch ein Modell des CCH-Dimers zu erhalten, wurde von der AG Gohlke der ungeordnete C-Terminus von CCH in ihrem Modell des CCH Δ -Dimers ergänzt. Jedoch ließen sich auf Basis der Strukturvorhersagen von CCH bzw. CCH Δ zunächst keine Aussagen darüber treffen, ob und inwiefern der C-Terminus bzw. die C-Termini in einem Dimer miteinander oder mit den N-terminalen Domänen interagieren, sodass im Rahmen des gemeinsamen Forschungsprojektes von der AG Gohlke MD-Simulationen durchgeführt wurden, um Erklärungsansätze für die experimentell ermittelten Unterschiede bzgl. der Affinität für die Dimerisierung zu erhalten.

Die MD-Simulationen unterstützen die experimentellen Daten und zeigen, dass die Dimerisierung unabhängig vom C-Terminus über die N-terminalen Domänen der Monomere erfolgt, da keine Interaktion der C-Termini miteinander beobachtet wurde. Die Interaktion der CCH-Monomere erfolgt nach demselben Mechanismus, welcher für das humane Homolog ATOX1 bereits identifiziert wurde [193, 194] (Kapitel 3.1 *Figure S6-S8*). Dennoch weisen einige Konformationen des CCH-Dimers Abstände zwischen Seitenketten des C-Terminus zur ersten α -Helix des anderen Monomers von weniger als 5 Å auf, was einen Ansatzpunkt für

eine Erklärung der höheren Affinität für die Dimerisierung von CCH im Vergleich zu CCH Δ liefert (Kapitel 3.1 *Figure S8*). Insgesamt deuten auch die MD-Simulationsdaten darauf hin, dass CCH stabilere Dimere ausbildet als CCH Δ , da für CCH häufiger Dimere in der geschlossenen Konformation beobachtet wurden, in welcher das Dimer sowohl durch das von beiden Monomeren komplexierte Cu(I)-Ion, als auch durch ein Wasserstoffbrücken-Netzwerk, welches zwischen beiden Monomeren ausgebildet wird, stabilisiert wird (Kapitel 3.1 *Figure S9*). Um Aminosäuren zu identifizieren, welche stabilisierend auf die CCH- bzw. CCH Δ -Dimere im apo- und kupferbeladenen Zustand wirken und somit letztendlich eine Aussage über die Funktion des C-Terminus von CCH in der Dimerisierung treffen zu können, wurde in Kooperation mit der AG Gohlke von dieser der Beitrag aller Aminosäuren an der Änderung der freien Gesamtenergie (ΔG) der Dimerisierung berechnet. Für CCH konnte dadurch gezeigt werden, dass durch den C-Terminus indirekt vermittelt mehr Aminosäuren (ca. 2x mehr) in der N-terminalen Domäne zur Stabilität des CCH-Dimers beitragen, als im CCH Δ -Dimer (sowohl im apo- als auch Cu(I)-beladenen Zustand). Zudem tragen auch die Seitenkette von T116 und K117 im C-Terminus zur Gesamtstabilität des Dimers bei (Kapitel 3.1 *Figure 6*). Weiterhin kompensiert der C-Terminus im Apo-Zustand in geringem Ausmaß den Verlust des stabilisierend-wirkenden Cu(I)-Ions, jedoch ist dieser Beitrag sehr gering und daher vernachlässigbar (Kapitel 3.1 *Figure 6*). Die aus den *in silico* Experimenten gewonnenen Ergebnisse unterstützen die experimentellen Ergebnisse und diese deuten gemeinsam erneut auf eine indirekte Wirkung des C-Terminus in Bezug auf die Stabilität des CCH-Dimers hin, indem dieser die Kontaktfläche beider CCH-Monomere im Dimer stabilisiert.

Da sowohl die *in vitro*, als auch *in silico* Daten zeigen, dass der C-Terminus von CCH sowohl ungeordnet vorliegt, als auch nicht direkt an der Dimerisierung beteiligt ist, wurde ebenfalls die (Thermo-) Stabilität von CCH und CCH Δ durch Schmelztemperatur-Analyse (T_m) mittels nDSF bestimmt. Basierend auf den zuvor ermittelte K_D -Werten ist anzunehmen, dass unter den hier getesteten Bedingungen (Proteinkonzentration: 120 μ M) CCH und CCH Δ hauptsächlich als Dimere vorliegen. Zwar wäre auch ein Vergleich der T_m der Monomere sinnvoll, dies erfordert jedoch Proteinkonzentrationen, welche 10-20x geringer als der K_D -Wert sind und damit im Falle von CCH und CCH Δ aufgrund der geringen Tyrosin- und Tryptophan-Fluoreszenz weit unterhalb der Nachweisgrenze des verwendeten Systems liegen. Zwar bietet der auf einem externen Farbstoff basierende *Thermal Shift Assay* (TSA), eine Alternative, jedoch ist dieser für IDPs nicht geeignet und die notwendigen Proteinkonzentrationen wären ebenfalls weit oberhalb der K_D -Werte [195].

Im Apo-Zustand ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen CCH und CCH Δ bezüglich ihrer Thermostabilität identifizieren, jedoch werden in Anwesenheit von Cu(I)-Ionen signifikante Unterschiede zwischen CCH und CCH Δ deutlich (Kapitel 3.1 *Figure 5*). Da alle

vorherigen Ergebnisse darauf hindeuten, dass der C-Terminus weder Cu(I)-Ionen bindet, noch direkt an der Dimerisierung beteiligt ist, deuten diese Ergebnisse erneut auf einen indirekten Effekt hin, welcher die stabilisierende Wirkung von Cu(I) auf CCH und CCH Δ im Falle von CCH verstärkt. Dieser positive Einfluss einer intrinsisch-ungeordneten Domäne (IDD) bzw. intrinsisch-ungeordneten Region (IDR) auf die (Thermo-) Stabilität eines Proteins ist jedoch kein Einzelfall und wurde auch von Ortega-Alacron *et al.* 2021 [196] im Zusammenhang mit einem verkürzten Konstrukt des Transkriptionsfaktors MeCP2 beschrieben. Dieses besteht aus einer ungeordneten, N-terminalen Domäne (NTD), auf welche eine Methyl-bindende Domäne (MeBD) mit einer geordneten Faltung sowie eine weitere IDD, eine intervenierende Domäne (ID) folgen [196]. Analog zu den hier auf Tryptophanfluoreszenz basierenden Thermostabilitätsanalysen von CCH und CCH Δ wurde mit derselben Methode und mittels *Differential Scanning Calorimetry* (DSC) die Stabilität von NTD-MeBD-ID MeCP2 und der MeBD allein in Abhängigkeit der Temperatur und der Konzentration eines Denaturierungsreagenz (Urea) untersucht. Auch hier wurde für die Variante mit den IDDs eine um 7-8°C höhere Schmelztemperatur beobachtet [196, 197]. Zudem wurde ebenfalls analog zu CCH und CCH Δ stets eine höhere Affinität von NTD-MeBD-ID für seinen Interaktionspartner beobachtet als für die MBD allein [197]. Dies ist zwar zumindest für NTD-MeBD-ID auf eine zweite Bindungsstelle in der ungeordneten ID-Domäne zurückzuführen [198], aber die in dieser Arbeit erhaltenen Daten der *in silico* Experimenten deuten auch für CCH auf zusätzliche Interaktionen durch den C-Terminus hin (Kapitel 3.1 *Figure 6* und *Figure S8*). Mögliche Erklärungen für diese stabilisierende Wirkung von IDDs bieten elektrostatische Wechselwirkungen über größere Distanzen die sowohl spezifisch als auch unspezifisch sein können sowie sterische Effekte der IDDs, die eine lokale Denaturierung erschweren bzw. bis zu einem bestimmten Punkt unterbinden können. Da die C-terminale Domäne von CCH einen Aspartat/Glutamat-Anteil von ca. 29% und einen Lysin-Anteil von ca. 16% aufweist und zudem ca. 30% von CCH ausmacht, sind solche Effekte auch für CCH denkbar.

4.2 Strukturelle Aspekte des Kupfertransfers zum Ethylenrezeptor ETR1

Durch AlphaFold2 [199] wurde im N-terminalen Bereich der kupfertransportierenden P_{1B}-Typ ATPase RAN1 (HMA7) eine degenerierte, metallbindende Domäne (MBD3) vorhergesagt, welche das für die MBDs und Kupferchaperone typische, ATX1-ähnliche (ATX1-like) Faltungsmotiv aufweist und zuvor durch sequenzbasierte Methoden nicht identifiziert wurde. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass in dieser Domäne nicht das für die Bindung von Cu(I)-Ionen notwendige und konservierte CxxC-Sequenzmotiv enthalten ist, wie es bei den MBDs einer Reihe verschiedener P_{1B}-Typ ATPasen der Fall ist [200]. Dieses ATX1-ähnliche Faltungsmotiv wurde erwartungsgemäß von AlphaFold2 auch für die zuvor identifizierten MBDs sowie für die Kupferchaperone ATX1 und CCH vorhergesagt. Im Zuge dieser Arbeit konnte die vorhergesagte Struktur von MBD3 mittels Röntgenstrukturanalyse bestätigt werden. Diese ist in zudem in Einklang mit einer Kristallstruktur der MBD1 von RAN1 [201], wodurch die Zuverlässigkeit bzw. Eignung der AlphaFold2-Vorhersagen für die hier verwendeten Strukturmodelle verdeutlicht wird. Ebenso konnte durch Einsatz von weiteren bioinformatischen und biochemischen Methoden gezeigt werden, dass MBD3 auch mit den Kupferchaperonen ATX1 und CCH sowie sehr wahrscheinlich auch mit dem Ethylenrezeptor ETR1 direkt interagiert (Kapitel 3.2 *Figure 2 & 6*) und somit potentiell Teil eines Mechanismus ist, mittels welchem Kupfer auf ETR1 übertragen wird. Bisher ist nicht bekannt, wie genau die Ethylenrezeptoren ihren Cu(I)-Kofaktor erhalten, jedoch konnte durch genetische Studien gezeigt werden, dass RAN1 essentiell für die Biogenese von funktionsfähigen Ethylenrezeptoren ist [20]. Zudem finden sich in der publizierten Literatur deutliche Hinweise auf eine direkte Interaktion von ETR1 und RAN1, was diese Hypothese zusätzlich unterstützt [69]. Der in dieser Arbeit bzw. in Kapitel 3.2 vorgeschlagene Mechanismus eines Kupfertransfers basiert auf der direkten Interaktion bzw. Bindung der N-terminalen MBDs von RAN1 mit den membrannahen Domänen von ETR1, wie der Linkerregion und der GAF-Domäne. Ein direkter Kontakt der MBDs mit der Transmembrandomäne (TMD) von ETR1 ist aufgrund der Abschirmung dieser Domäne durch die Einbettung des Rezeptors in eine Phospholipid-Doppelmembran nicht möglich, weshalb eine Interaktion nur über die cytosolischen Domänen des Rezeptors erfolgen kann. Da sowohl die MBDs von RAN1, als auch ATX1 und CCH in der Lage sind Cu(I)-Ionen zu binden und strukturell ähnlich sind (Kapitel 3.1 *Figure 7*, Kapitel 3.2 *Figure 2* und Referenzen [69, 202]), erscheint eine direkte Übertragung von Cu(I)-Ionen theoretisch möglich, insbesondere da eine Übertragung von Cu(I)-Ionen von ATX1 und CCH auf ein verkürztes ETR1-Konstrukt, welches nur aus der Transmembrandomäne und der Linkerregion besteht, bereits demonstriert wurde [69].

Um einen potentiellen Mechanismus der Kupfertransfers ableiten zu können, wurden zunächst relevante Kontaktflächen der interagierenden Proteine durch Kooperation mit der AG Gohlke

in silico vorhergesagt bzw. identifiziert und anschließend Modelle für Komplexe bestehend aus ETR1 und den RAN1 MBDs sowie aus ETR1 und den Kupferchaperonen ATX1 und CCH generiert bzw. zur Verfügung gestellt. Die erhaltenen Modelle wurden anschließend mit Daten aus *in vitro* Interaktionsexperimenten überprüft und anhand dieser weiterentwickelt. Um ein möglichst genaues Modell für diese Interaktionen zu erhalten, war u.a. auch die strukturelle bzw. Domänen-Organisation von CCH erforderlich, dessen Charakterisierung in Kapitel 3.1 ausführlich beschrieben ist und in Kapitel 4.1 diskutiert wird. Da gezeigt werden konnte, dass dessen C-terminale Domäne intrinsisch ungeordnet ist und nicht an der Kupferbindung dieses Proteins beteiligt ist, wurde diese Domäne von CCH bei der Vorhersage von Interaktionskomplexen zwecks Vereinfachung der Vorhersage nicht betrachtet (CCH Δ).

Durch die *deep learning* Methode GLINTER [203] wurde zunächst die α -helikale Linkerregion von ETR1 für ATX1, CCH Δ und MBD3 als potentielle Kontaktfläche identifiziert, wohingegen für MBD1 und MBD2 hauptsächlich die GAF-Domäne als potentielle Kontaktfläche identifiziert wurde. Die vorhergesagten Kontaktflächen in ATX1, CCH Δ sowie MBD1 und MBD2 befinden sich in der Nähe der Kupferbindungsmotive (*Copper Binding Motif*, CBM) dieser Proteine bzw. handelt es sich um das jeweilige CBM selbst (Kapitel 3.2 *Figure 3*). Diese Orientierung deutet auf die Möglichkeit einer Übertragung von Cu(I)-Ionen von den Kupferchaperonen auf den Rezeptor hin und ist in Einklang mit den in Referenz [69] publizierten Daten. Entgegen den Erwartungen wurden durch GLINTER jedoch sowohl für MBD1 als auch für MBD2 hauptsächlich Kontaktflächen im Bereich der GAF-Domäne, aber nicht in der Linkerregion von ETR1 vorhergesagt (Kapitel 3.2 *Figure 3*), was einem potentiellen Kupfertransfer dieser Domänen auf ETR1 bzw. dessen TMD widerspricht, da die entsprechenden Kontaktflächen weit von der TMD entfernt sind (Kapitel 3.2 *Figure 3*). Weiterhin wurde für die degenerierte MBD3 die höchste Wahrscheinlichkeit einer Interaktion mit ETR1 vorhergesagt, besonders mit der TMD-nahen Linkerregion von ETR1 Kapitel 3.2 *Figure 3*. Dies steht jedoch mit den MST-Daten in Widerspruch (Kapitel 3.2 *Figure 2*), da hier eine eindeutige Interaktion von MBD1 und MBD2 mit ETR1 (genauer ETR1_GAF) identifiziert wurde, wohingegen eine Interaktion von MBD3 mit ETR1 weder eindeutig bestätigt, noch ausgeschlossen werden konnte (Kapitel 3.2 *Figure 2*). Um hier jedoch eine eindeutige Aussage treffen zu können, sind weitere Experimente nötig. Qualitative Aussagen bzgl. einer möglichen Interaktion können beispielweise mittels Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) oder Fluoreszenzkomplementations-Experimenten getroffen werden, eine Quantifizierung könnte z.B. durch *Microfluidic Diffusional Sizing* (MDS), SPR oder *Bio-Layer Interferometry* (BLI) erfolgen. Jedoch sollten bei allen Methoden mehrere Strategien zur Fluoreszenz-Markierung/Immobilisierung verfolgt werden, da die Markierung/Immobilisierung eines Interaktionspartners die Bindung an das Zielprotein stören bzw. vollständig unterdrücken kann. Da für die hier durchgeführten MST-Experimente ebenfalls eine Markierung mit einem

Fluoreszenzfarbstoff nötig war und diese durch eine unspezifische Markierung von zugänglichen Lysinen bzw. primären Aminen mittels eines NHS-Ester-Farbstoffkonjugats erfolgte, ist dies auch eine mögliche Erklärung für die nicht eindeutigen, MST-basierten Ergebnisse der Interaktion von ETR1 und MBD3. Da bei den MST-Experimenten ETR1 markiert wurde, könnte die uneindeutige Bindung von MBD3 an ETR1 zudem auf eine Kontaktstelle hindeuten, die sich von den Kontaktstellen von MBD1 und MBD2 unterscheidet. Bei ausreichender Stabilität des Komplexes, könnte der Nachweis einer Interaktion auch qualitativ und ohne potentiell störende Modifikationen mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) erfolgen. Kritisch muss aber auch die verwendete Methode zur Vorhersage potentieller Kontaktflächen betrachtet werden (hier GLINTER). Für eine hohe Genauigkeit der Kontaktstellenvorhersage mittels GLINTER sind ausreichend coevolutive Informationen der interagierenden Proteine erforderlich, jedoch können die vorhergesagten Kontaktstellen als Anhaltspunkte für *Docking*-Experimente genutzt werden [203], welche, wie in Kapitel 3.2 ersichtlich ist, auch durchgeführt wurden.

Die durch *Docking* der MBD-, RAN1- und ETR1-Modelle erhaltenen Komplexe (Kapitel 3.2 *Figure 4 & 5*) sowie der durch AlphaFold3 vorhergesagte Interaktionskomplex von ETR1 und RAN1 (Kapitel 3.2 *Figure S2*) sind in Einklang mit den Ergebnisse der MST-Experimente bzgl. einer Interaktion von ETR1 mit RAN1 durch dessen MBDs. Auch ist eine *in vivo* Interaktion von ETR1 und RAN1 in der Literatur beschrieben [69]. Abhängig davon, ob jedoch die isolierten/freien MBDs oder Vollängen RAN1 bzw. verkürzte Varianten von diesem für das *Docking* verwendet wurden, unterscheiden sich die exakten Positionen der MBDs im ETR1-RAN1 Interaktionskomplex. Dies könnte neben dem verwendeten Programm/Algorithmus zur Vorhersage der Kontaktstellen und Proteinkomplexe auf die (strukturelle) Ähnlichkeit der MBDs zurückzuführen sein. Die genaue Position der einzelnen MBDs im Interaktionskomplex könnte im Vollängenprotein durch sterische Effekte eingeschränkt sein, wodurch sich die Ergebnisse für Vollängen RAN1 und die isolierten MBDs unterscheiden. Auch hat u.a. sowohl die Art, als auch die Länge des die MBDs verbindenden Linkers Einfluss auf deren zugängliche Bereiche in Bezug auf ETR1 sowie auf die Dynamik der MBDs untereinander. Andererseits könnte dies auch auf eine Dynamik der MBDs bei der Bindung an ETR1 hinweisen, wodurch keine dauerhaften Bindungen an eine bestimmte Kontaktfläche vorliegen, sondern diese dynamisch von verschiedenen MBDs besetzt werden. Dieser Einfluss des Linkers auf die Dynamik der MBDs ist auch für die humanen P_{1B}-Typ ATPasen ATP7A [204] und ATP7B beschrieben [205, 206]. ATP7A enthält z.B. eine metastabile MBD (HMA1A) zwischen MBD1 und MBD2, welcher ebenfalls das konservierte CxxC-Sequenzmotiv fehlt und von welcher angenommen wird, dass diese Domäne aufgrund ihres Einflusses auf die Dynamik von MBD1 und MBD2 an der Regulation der ATPase beteiligt sein könnte [204]. Für ATP7B konnte gezeigt werden, dass nur die inneren MBDs (MBD5 oder MBD6) für die Funktion des Cu(I)-

Transfers zur Eintrittsstelle in der TMD essentiell sind, wobei sich diese Domänen über große Distanzen bewegen müssen und MBD5 zusätzlich auch mit den in das Cytosol gerichteten P- und A-Domänen der ATPase interagieren kann [207]. Hier beträgt die Länge des Linkers zwischen der TMD und MBD6 20 Aminosäuren, zwischen MBD5&6 hingegen nur fünf Aminosäuren und zwischen MBD4&5 sogar 76 Aminosäuren [208, 209] woran deutlich wird, dass die Funktion der MBDs auch durch die Linker mitbestimmt wird.

Die hier identifizierten bzw. vorhergesagten potentiellen Kontaktflächen von ETR1 und RAN1 können als Ausgangspunkt für zukünftige Experimente dienen, in welchen der Einfluss von zielgerichteten Mutationen und somit die Relevanz von einzelnen Aminosäuren für die Ausbildung und Stabilität des Interaktionskomplexes untersucht wird. Für diesen Zweck eignet sich z.B. *Alanine-scanning* [210, 211]. Dadurch ließen sich die hier vorhergesagten Kontaktflächen experimentell überprüfen, wodurch weitere Einblicke in die Interaktion von ETR1 und RAN1 erhalten werden können. Werden diese gezielten Mutationen nicht nur auf die Kontaktflächen der MBDs und ETR1 beschränkt, sondern auch auf die TMD von ETR1 ausgeweitet, ließe sich damit evtl. auch die Route des Cu(I)-Ions in die ETR1 TMD hinein nachverfolgen, wo dieses schließlich im Fall von ETR1 aus *A. thaliana* von Cys65 und His69 koordinativ gebunden wird und für die Bindung von Ethylen an den Rezeptor mit hoher Affinität ermöglicht [31, 177, 212, 213]. Dies setzt allerdings voraus, dass der Transfer von Cu(I) von den einzelnen MBDs auf ETR1 zuvor experimentell demonstriert wird. Die Vielzahl von Aminosäuren, welche in der Lage sind Cu(I)-Ionen zu komplexieren und in der Linkerregion sowie der TMD von ETR1 lokalisiert sind (vgl. Kapitel 3.2 *Figure 4*) deuten aber darauf hin, dass der beschriebene Transfer von Cu(I)-Ionen von RAN1 auf ETR1 theoretisch möglich ist. Zudem erscheint ein Cu(I)-Transfer dadurch wahrscheinlich, dass in den *Docking*-Experimenten die CBMs der MBDs und die oben genannten Aminosäuren in ETR1 als zueinander ausgerichtet vorhergesagt werden, was für den Cu(I)-Transfer essentiell ist (vgl. Kapitel 3.2 *Figure 4*).

4.3 Mechanismus des proteinvermittelten Kupfertransfers zum Ethylenrezeptor ETR1 an der ER-Membran

Nach dem in Kapitel 3.2 (*Figure S3*) bzw. in dieser Arbeit vorgeschlagenen, RAN1-vermittelten Transfer von Kupfer auf ETR1 bindet RAN1 zunächst mittels seiner degenerierten MBD (MBD3) an ETR1 und bildet somit einen Komplex mit dem Ethylenrezeptor. MBD1 wird aufgrund seiner höheren Mobilität als MBD2 zunächst durch ATX1 mit Kupfer beladen und übergibt das Cu(I)-Ion anschließend an MBD2. MBD2 bindet an der Linkerregion von ETR1 und somit in der Nähe der ETR1 TMD und überträgt wiederum das Cu(I)-Ion auf ETR1 (Kapitel 3.2 *Figure 4 & 5*). Ein ähnlicher Mechanismus, in welchen nur die äußeren und somit leichter zugänglichen MBDs Kupfer von einem ATX1-ähnlichen Chaperon aufnehmen ist z.B. für ATP7B beschrieben [214]. Bei RAN1 handelt es sich bei dem beliefernden Kupferchaperon wahrscheinlich um ATX1, da dessen Affinität ca. 10-20x höher für die RAN1 MBDs ist, als die von CCH (vgl. Kapitel 3.2 *Figure 6*). Dies ist auch in Einklang mit der Annahme, dass ATX1 für einen intrazellulären Kupfertransport und CCH für einen interzellulären Kupfertransport zuständig ist [65] sowie einer entgegengesetzten Regulation der Expression dieser beiden Kupferchaperone [23].

Eine stabilisierende Funktion von MBD3 ist zudem in Einklang mit der Abwesenheit des CBMs in dieser Domäne, obwohl im Rahmen dieser Arbeit eine Bindung von Cu(I)-Ionen durch MBD3 demonstriert werden konnte (Kapitel 3.2 *Figure 2*). Fraglich ist jedoch, ob diese Cu(I)-Bindung von physiologischer Relevanz ist, oder ob es sich um ein experimentelles Artefakt handelt. Da ein Einfluss des *His*-tags nicht vollständig ausgeschlossen werden konnte (Kapitel 3.2 *Figure 2*), sind hier für eine Beantwortung der Frage nach einer physiologischen Relevanz der Kupferbindung von MBD3 weitere Experimente notwendig. Möglich wäre, dass die Cu(I)-Bindung von MBD3 durch ein Zusammenspiel des *His*-tags mit weiteren Aminosäureseitenketten des Proteins zustande kommt. Daher wäre es sinnvoll, diese Experimente durch Cu(I)-Bindungsexperimente mit MBDs ohne *His*-tag zu ergänzen. Um z.B. eine unvollständige Abspaltung des *His*-tags durch eine geeignete bzw. der Klonierungsstrategie entsprechenden Protease auszuschließen, wäre eine neue Klonierungs- und Reinigungsstrategie der MBDs erforderlich. Die MBDs könnten dementsprechend als Fusionsproteine kloniert werden, an welchen sich N-terminal ein geeignetes, zusätzliches Protein wie z.B. das Maltose-bindende Protein MBP [215] gefolgt von einer Protease-Schnittsequenz befindet, mit der Bedingung, dass das zusätzlichen Protein ein deutlich höheres Molekulargewicht aufweist, sodass nach proteolytischem Verdau mit der entsprechenden Protease die abgespaltenen MBDs vollständig vom ungespaltenen Fusionsprotein mittels SEC voneinander abgetrennt werden können. Durch dieses Vorgehen

ließen sich zudem mehrere Reinigungsschritte, wie z.B. die Entfernung von Aggregaten, Protease und ggf. vorhandenen, höheren oligomeren Zuständen zusammenfassen.

Andererseits befindet sich im C-Terminus von MBD3 ein SxxS-Sequenzmotiv, welches dem CxxC-Sequenzmotiv der MBDs und Kupferchaperone strukturell ähnlich ist (Kapitel 3.2 *Figure 1*). Obwohl es sich bei der Hydroxylgruppe in der Seitenkette von Serin um eine harte Base handelt, konnte eine Cu(I)-Bindung durch dieses SxxS-Motiv im Rahmen von Cystein-zu-Serin Mutationen in den MBDs der P_{1B}-Typ ATPase ATP7B, dem humanen Homolog des pflanzlichen RAN1, mit verschiedenen biochemischen und biophysikalischen Methoden, wie z.B. *Electron Paramagnetic Resonance* (EPR)-Spektroskopie, nachgewiesen werden [216]. Daher ist auch eine Funktion von MBD3 sowohl bei der Übertragung von Cu(I)-Ionen auf ETR1, als auch bei der Regulation von RAN1 denkbar. Kann eine Bindung von Cu(I)-Ionen an MBD3 durch den *His*-tag oder eines *His*-tag assoziierten Effekts ausgeschlossen werden, wäre die Abklärung einer physiologischen Relevanz der Cu(I)-Bindung durch MBD3 sinnvoll. Dafür könnte z.B. der *triple-response* Assay unter Verwendung von Serin-zu-Alanin Mutanten des SxxS-Motivs der MBD3 verwendet werden sowie ein Aktivitäts-Assay, mittels welchem die ATPase Aktivität des RAN1-Wildtyps mit der Aktivität einer MBD3 Serin-zu-Alanin Mutante verglichen werden kann. In Referenz [137] ist neben einem Protokoll für einen entsprechenden ATPase-Assay zudem ein Protokoll für die Rekonstitution der P_{1B}-Typ ATPase CopA in Liposomen beschrieben, welches evtl. auch für RAN1 verwendet werden könnte bzw. als Ausgangspunkt für die Etablierung eines Rekonstitutionsprotokolls von RAN1 in Liposomen fungieren kann. Da es sich bei RAN1 um ein Membranprotein handelt, könnte durch die Rekonstitution in Liposomen eine Umgebung geschaffen werden, welche der natürlichen Umgebung dieses Proteins ähnlicher ist. Dadurch ließen sich sämtliche Analysen im Vergleich zu Detergenz-solubilisiertem Protein unter physiologisch relevanteren Bedingungen durchführen. Dass Detergenzien einen (negativen) Einfluss auf die Stabilität und Aktivität von Membranproteinen haben können, ist in der Literatur beschrieben [217, 218].

Neben dem hier vorgeschlagenen, RAN1-vermittelten Kupfertransfer existiert in der Literatur aber auch ein Hinweis auf eine alternative Kupfertransferroute, mittels welcher die Kupferchaperone ATX1 und CCH, unter Umgehung von RAN1, ETR1 direkt mit Kupfer beladen können. Dies wurde *in vitro* sowohl anhand einer hochaffinen Bindung von ATX1 ($K_D = 313 \pm 74$ nM) und CCH ($K_D = 526 \pm 101$ nM) an ein ETR1-Konstrukt, bestehend aus der TMD und der Linkerregion von ETR1 (ETR1_1-157) sowie der Fähigkeit von ATX1 und CCH, Kupfer auf ETR1_1-157 zu übertragen, gezeigt [69]. Diese *in vitro* Experimente deuten zunächst darauf hin, dass der Chaperon-vermittelte Kupfertransfer gegenüber dem RAN1-vermittelten Kupfertransfer begünstigt ist, da die isolierten MBDs im direkten Vergleich eine deutlich geringere Affinität für ETR1 (K_D -Werte = 6 – 13 μ M, vgl. Kapitel 3.2 *Figure 2*) aufweisen.

Dies kann jedoch durch die verwendeten ETR1-Konstrukte erklärt werden. Das ETR1-Konstrukt, welches für die in Kapitel 3.2 *Figure 2* dargestellten Interaktionsstudien verwendet wurde (ETR1_GAF), enthält gegenüber ETR1_1-157 zusätzlich die GAF-Domäne, wodurch zusätzliche, sterische Einschränkungen, wie sie auch im vollständigen ETR1-Protein vorkommen, in diesem Konstrukt enthalten sind.

Diese Erklärung wird u.a. auch durch Beobachtungen aus *triple-response* Assays gestützt. Eine bestimmte Mutation im RAN1-Gen (*ran1-3*) von *Arabidopsis*, in welcher Glycin an Position 759 durch Arginin substituiert ist, führt zum Funktionsverlust von RAN1 und dadurch zu einer konstitutiven Aktivierung des Ethylensignalwegs [118]. Somit zeigt diese Mutante sowohl in Anwesenheit, als auch in Abwesenheit von Ethylen den *triple-response*-Phänotyp. Eine Beladung des Ethylenrezeptors durch die Kupferchaperone findet *in vivo* unter physiologisch-relevanten Bedingungen daher vermutlich nicht statt, da ansonsten die Rezeptoren ihren Kupfer-Kofaktor durch die Kupferchaperone erhalten würden und sich somit nicht vom Wildtyp unterscheiden sollten. Eine mögliche Erklärung, welche diese Beobachtung sowie die Interaktionsstudien bzgl. ETR1_GAF und ETR1_1-157 berücksichtigt, liefert die Annahme, dass ETR1_GAF den nativen bzw. nativeren Zustand von ETR1 darstellt, wohingegen ETR1_1-157 ein Abbauprodukt des Rezeptors imitieren könnte. Die hochaffine Bindung von ATX1 und CCH an ETR1_1-157 könnte demnach darauf hindeuten, dass diese Kupferchaperone Cu(I)-Ionen aus Abbauprodukten des Rezeptors recyceln wohingegen die direkte Interaktion von ETR1 und RAN1 der Beladung des Rezeptors mit Cu(I)-Ionen dienen könnte. Dass sich ETR1_1-157 nach Referenz [69] auch durch ATX1 bzw. CCH mit Kupfer beladen lässt, könnte weiterhin darauf hindeuten, dass es keine signifikanten Unterschiede bzgl. der Affinität der beteiligten Proteine für Kupfer gibt und das Gleichgewicht der Reaktion durch die Konzentrationen der Reaktanden leicht verschoben werden kann. Dies wäre auch in Einklang mit der Beobachtung, dass in Referenz [69] bei einer doppelt so hohen Konzentration von ATX1 und CCH in Bezug auf ETR1_1-157 keine vollständige Beladung des Rezeptors erzielt werden konnte. Unter der Annahme gleicher Cu(I)-Affinitäten der beiden beteiligten Proteine, entspräche der Grad der Beladung des jeweiligen Proteins nach Inkubation beider Proteine miteinander dem Verhältnis von Kupfer zum Gesamtprotein. Daher wäre zu erwarten, dass jeweils 2/3 des Rezeptors und 2/3 des Kupferchaperons mit Kupfer beladen wären, da zu Beginn das gesamte Kupfer an das Kupferchaperon gebunden vorlag und das beladene Kupferchaperon (und somit auch das Kupfer) einen Anteil von 2/3 am Gesamtprotein hat. Unter Berücksichtigung, dass auch ETR1_1-157 zu Beginn bereits zu ca. 20 % mit Kupfer beladen war [69], wäre unter der Annahme gleicher Cu(I)-Affinitäten eine Steigerung der Beladung mit Kupfer auf ca. 73 % zu erwarten gewesen. Dies stimmt gut mit den experimentell ermittelten Werten für die Beladung von ETR1_1-157 durch Cu(I)-beladenes ATX1 bzw. CCH überein, welche in dem beschriebenen Szenario auf 60-70 %

gesteigert werden konnte [69]. Die Abweichung vom erwarteten Wert kann dadurch erklärt werden, dass die Cu(I)-Affinitäten von ETR1_157 und den Kupferchaperonen nicht absolut identisch sind, sich aber dennoch in ähnlichen Größenordnungen befinden. Einen weiteren Einflussfaktor stellt der Grad der Beladung der Kupferchaperone dar, für welchen 100 % (entspricht einem Cu(I)-Ion pro Monomer) bei der Berechnung des zu erwartenden Beladungsgrad von ETR1_157 angenommen wurden. Dass dies nicht unbedingt der Fall ist, wird z.B. am Beispiel der Cu(I)-verbundenen Dimere der Kupferchaperone deutlich [74] (vgl. Kapitel 3.1). Die Annahme, dass die Cu(I)-Affinitäten des Rezeptors und der Kupferchaperone nicht signifikant verschieden sind, ist weiterhin auch in Einklang mit der beschriebenen kinetischen Kontrolle des Kupfertransfers durch Kupferchaperone [76]. Demnach unterscheiden sich die Affinitäten der beteiligten Proteine für Kupfer nur geringfügig, gleichzeitig wird trotz der generell hohen Affinität der beteiligten Proteine für Kupfer [59], ein schneller Austausch des Cu(I)-Ions ermöglicht [76].

Diese Theorie könnte zudem durch die Durchführung desselben Experiments mit Cu(I)-beladenem Rezeptor (ETR1_1-157) und den Kupferchaperonen im apo-Zustand überprüft werden. Auch sprechen für eine Kupferbeladung von ETR1 durch RAN1 basierend auf einer direkten Interaktion beider Proteine, Experimente, in welchen die Bindung von ¹⁴C-markierten Ethylen an ETR1 untersucht wurden. In diesen Experimenten wurden isolierte Membranen von Hefe verwendet, in welcher ETR1 heterolog exprimiert wurde. Die Bindung von Ethylen konnte in diesen Experimenten gesteigert werden, wenn dem Puffer, welcher für die Resuspendierung der isolierten Membranen verwendet wurde, CuSO₄ zugesetzt wurde [219]. Dies könnte auf einen Kupfertransfer durch RAN1 hindeuten, da in diesen Experimenten aufgrund des Aufbaus des Experimentes, keine löslichen Kupferchaperone vorhanden waren [219]. Da das CxxC-Motiv der RAN1-MBDs Ähnlichkeit zu DTT aufweist und DTT bereits verwendet wurde, um Cu(II) zu Cu(I) zu reduzieren [220], ist eine Reduktion von Cu(II) zu Cu(I) durch eine MBD denkbar, welches dann von der benachbarten MBD gebunden und anschließend auf ETR1 übertragen wird. Um weiter zu überprüfen, ob die Interaktion von ETR1 und RAN1 auch *in vivo* spezifisch erfolgt, könnten zudem mehrere *in vivo* bzw. *in planta* sowie *in vitro* Kontrollexperimente durchgeführt werden, in welchen die Interaktion von ETR1 mit einer RAN1-verwandten P-Typ ATPase, wie z.B. der Ca²⁺-Pumpe ECA1 durchgeführt werden. Diese ist in *Arabidopsis* ebenfalls in der Membran des ER lokalisiert und aufgrund ihrer Spezifität für Calcium als Kontrollproteine geeignet [221]. Der Wildtyp von ECA1 könnte in diesen Experimenten als Negativ-Kontrolle dienen, ein Fusionsprotein, bestehend aus ECA1 und den RAN1-MBDs hingegen als Positiv-Kontrolle, da dieses nun aufgrund der RAN1-MBDs mit ETR1 interagieren sollte. Mit diesen Experimenten ließen sich somit weitere Hinweise bzw. Beweise für eine spezifische Interaktion von ETR1 mit RAN1 gewinnen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass im Zuge dieser Arbeit das Kupferchaperon CCH ausführlich biochemisch und biophysikalisch charakterisiert wurde und dadurch erstmals die strukturellen Eigenschaften des Volllängenproteins genauer bestimmt wurden. Die gewonnenen Erkenntnisse können dazu beitragen, die spezifischen Aufgaben der Kupferchaperone ATX1 und CCH in der pflanzlichen Kupferhomöostase sowie ihrer unterschiedlichen Rollen im Kupfertransport zu identifizieren. Ebenso konnte eine Hypothese für einen möglichen Mechanismus entwickelt werden, nach welcher ETR1 seinen Cu(I)-Kofaktor durch eine direkte Protein-Protein-Interaktion mit RAN1 erhält. Dieses Modell ist in Einklang mit den vorhandenen Informationen und stellt einen Ausgangspunkt für künftige Experimente dar, in welchen die Interaktion von ETR1 mit RAN1 sowie mit den Kupferchaperonen ATX1 und CCH weiter analysiert werden kann. Dadurch lassen sich weitere und tiefgehende Einblicke in den Beladungsprozess von ETR1 mit Kupfer erhalten. Dieser Prozess ist von entscheidender Bedeutung für die Funktionalität des Ethylenrezeptors ETR1 und somit für den Ethylensignalweg in Pflanzen.

5 Literatur

1. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) (2019) Transition element.
2. Festa, R. A. & Thiele, D. J. (2011) Copper: an essential metal in biology, *Curr Biol.* **21**, R877-83.
3. Koebke, K. J., Alfaro, V. S., Pinter, T. B. J., Deb, A., Lehnert, N., Tard, C., Penner-Hahn, J. E. & Pecoraro, V. L. (2020) Traversing the Red-Green-Blue Color Spectrum in Rationally Designed Cupredoxins, *J Am Chem Soc.* **142**, 15282-15294.
4. Solomon, E. I. (2006) Spectroscopic methods in bioinorganic chemistry: blue to green to red copper sites, *Inorg Chem.* **45**, 8012-25.
5. Albright, T. A. (1982) Tetrahedron report number 126: Structure and reactivity in organometallic chemistry. An applied molecular orbital approach, *Tetrahedron.* **38**, 1339-1388.
6. Börgel, J., Campbell, M. G. & Ritter, T. (2016) Transition Metal d-Orbital Splitting Diagrams: An Updated Educational Resource for Square Planar Transition Metal Complexes, *J Chem Educ.* **93**, 118-121.
7. He, M., Hu, Q., Mei, Y., Zhou, B., Kong, J. & Zhang, X. (2018) Metal-to-Ligand Charge-Transfer-based Visual Detection of Alkaline Phosphatase Activity, *Anal Sci.* **34**, 341-347.
8. Johnson, D. K., Stevenson, M. J., Almadidy, Z. A., Jenkins, S. E., Wilcox, D. E. & Grosseohme, N. E. (2015) Stabilization of Cu(I) for binding and calorimetric measurements in aqueous solution, *Dalton Trans.* **44**, 16494-505.
9. Burg, A. & Meyerstein, D. (2012) Chapter 7 - The chemistry of monovalent copper in aqueous solutions in *Adv Inorg Chem* (Eldik, R. v. & Ivanović-Burmazović, I., eds) pp. 219-261, Academic Press.
10. Singha, A., Sekretareva, A., Tao, L., Lim, H., Ha, Y., Braun, A., Jones, S. M., Hedman, B., Hodgson, K. O., Britt, R. D., Kosman, D. J. & Solomon, E. I. (2023) Tuning the Type 1 Reduction Potential of Multicopper Oxidases: Uncoupling the Effects of Electrostatics and H-Bonding to Histidine Ligands, *J Am Chem Soc.* **145**, 13284-13301.
11. Springs, S. L., Bass, S. E., Bowman, G., Nodelman, I., Schutt, C. E. & McLendon, G. L. (2002) A multigeneration analysis of cytochrome b(562) redox variants: evolutionary strategies for modulating redox potential revealed using a library approach, *Biochemistry.* **41**, 4321-8.
12. Hosseinzadeh, P. & Lu, Y. (2016) Design and fine-tuning redox potentials of metalloproteins involved in electron transfer in bioenergetics, *Biochim Biophys Acta.* **1857**, 557-581.
13. Rotzinger, F. P. (2005) Treatment of substitution and rearrangement mechanisms of transition metal complexes with quantum chemical methods, *Chem Rev.* **105**, 2003-37.
14. Frank, P., Benfatto, M., Szilagyi, R. K., D'Angelo, P., Della Longa, S. & Hodgson, K. O. (2005) The solution structure of [Cu(aq)]²⁺ and its implications for rack-induced bonding in blue copper protein active sites, *Inorg Chem.* **44**, 1922-33.
15. Halcrow, M. A. (2013) Jahn-Teller distortions in transition metal compounds, and their importance in functional molecular and inorganic materials, *Chem Soc Rev.* **42**, 1784-95.
16. Pearson, R. G. (1963) Hard and Soft Acids and Bases, *J Am Chem Soc.* **85**, 3533-3539.
17. Hansch, R. & Mendel, R. R. (2009) Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl), *Curr Opin Plant Biol.* **12**, 259-66.

18. Abdel-Ghany, S. E. (2009) Contribution of plastocyanin isoforms to photosynthesis and copper homeostasis in *Arabidopsis thaliana* grown at different copper regimes, *Planta*. **229**, 767-79.
19. Ahsan, N., Lee, D. G., Lee, S. H., Kang, K. Y., Lee, J. J., Kim, P. J., Yoon, H. S., Kim, J. S. & Lee, B. H. (2007) Excess copper induced physiological and proteomic changes in germinating rice seeds, *Chemosphere*. **67**, 1182-93.
20. Binder, B. M., Rodriguez, F. I. & Bleecker, A. B. (2010) The copper transporter RAN1 is essential for biogenesis of ethylene receptors in *Arabidopsis*, *J Biol Chem*. **285**, 37263-70.
21. Printz, B., Lutts, S., Hausman, J. F. & Sergeant, K. (2016) Copper Trafficking in Plants and Its Implication on Cell Wall Dynamics, *Front Plant Sci*. **7**, 601.
22. Seigneurin-Berny, D., Gravot, A., Auroy, P., Mazard, C., Kraut, A., Finazzi, G., Grunwald, D., Rappaport, F., Vavasseur, A., Joyard, J., Richaud, P. & Rolland, N. (2006) HMA1, a new Cu-ATPase of the chloroplast envelope, is essential for growth under adverse light conditions, *J Biol Chem*. **281**, 2882-92.
23. del Pozo, T., Cambiazo, V. & Gonzalez, M. (2010) Gene expression profiling analysis of copper homeostasis in *Arabidopsis thaliana*, *Biochem Biophys Res Commun*. **393**, 248-52.
24. Bernal, M., Casero, D., Singh, V., Wilson, G. T., Grande, A., Yang, H., Dodani, S. C., Pellegrini, M., Huijser, P., Connolly, E. L., Merchant, S. S. & Kramer, U. (2012) Transcriptome sequencing identifies SPL7-regulated copper acquisition genes FRO4/FRO5 and the copper dependence of iron homeostasis in *Arabidopsis*, *Plant Cell*. **24**, 738-61.
25. Gonzalez-Guerrero, M. & Arguello, J. M. (2008) Mechanism of Cu⁺-transporting ATPases: soluble Cu⁺ chaperones directly transfer Cu⁺ to transmembrane transport sites, *Proc Natl Acad Sci U S A*. **105**, 5992-7.
26. Sancenon, V., Puig, S., Mira, H., Thiele, D. J. & Penarrubia, L. (2003) Identification of a copper transporter family in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Mol Biol*. **51**, 577-87.
27. Puig, S., Mira, H., Dorcey, E., Sancenon, V., Andres-Colas, N., Garcia-Molina, A., Burkhead, J. L., Gogolin, K. A., Abdel-Ghany, S. E., Thiele, D. J., Ecker, J. R., Pilon, M. & Penarrubia, L. (2007) Higher plants possess two different types of ATX1-like copper chaperones, *Biochem Biophys Res Commun*. **354**, 385-90.
28. Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. (1985) The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases, *Mol Aspects Med*. **8**, 89-193.
29. Kehrer, J. P. (2000) The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity, *Toxicology*. **149**, 43-50.
30. Gill, S. S. & Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, *Plant Physiol Biochem*. **48**, 909-30.
31. Rodriguez, F. I., Esch, J. J., Hall, A. E., Binder, B. M., Schaller, G. E. & Bleecker, A. B. (1999) A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*, *Science*. **283**, 996-8.
32. Wang, J., Moeen-Ud-Din, M., Yin, R. & Yang, S. (2022) ROS Homeostasis Involved in Dose-Dependent Responses of *Arabidopsis* Seedlings to Copper Toxicity, *Genes (Basel)*. **14**.
33. Hunter, C., Sun, Z., Mansfield, S. D., Shahbaz, M., Pilon, M. & Gleason, S. M. (2023) The effects of copper deficiency on lignification, xylem vessel structure, and hydraulic traits in hybrid poplar, *Physiol Plant*. **175**, e14006.

34. Brun, L. A., Le Corff, J. & Maillet, J. (2003) Effects of elevated soil copper on phenology, growth and reproduction of five ruderal plant species, *Environ Pollut.* **122**, 361-8.
35. Chai, L. X., Dong, K., Liu, S. Y., Zhang, Z., Zhang, X. P., Tong, X., Zhu, F. F., Zou, J. Z. & Wang, X. B. (2020) A putative nuclear copper chaperone promotes plant immunity in Arabidopsis, *J Exp Bot.* **71**, 6684-6696.
36. Murphy, A. & Taiz, L. (1995) A New Vertical Mesh Transfer Technique for Metal-Tolerance Studies in Arabidopsis (Ecotypic Variation and Copper-Sensitive Mutants), *Plant Physiol.* **108**, 29-38.
37. Thornton, I. (1979) Copper in the environment, *Part I: Ecological Cycling John Wiley and Sons, Toronto.*
38. Northmore, J. M. (1959) Iodine and Copper Uptake by Soil Organic Matter, *Nature.* **183**, 1309-1310.
39. Cornu, J. Y., Staunton, S. & Hinsinger, P. (2007) Copper concentration in plants and in the rhizosphere as influenced by the iron status of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.), *Plant Soil.* **292**, 63-77.
40. Lair, G., Gerzabek, M. H. & Haberhauer, G. (2007) Retention of copper, cadmium and zinc in soil and its textural fractions influenced by long-term field management, *Eur J Soil Sci.* **58**, 1145-1154.
41. Lair, G. J., Gerzabek, M. H., Haberhauer, G., Jakusch, M. & Kirchmann, H. (2006) Response of the sorption behavior of Cu, Cd, and Zn to different soil management, *J Plant Nutr Soil Sci.* **169**, 60-68.
42. Wintz, H., Fox, T., Wu, Y. Y., Feng, V., Chen, W., Chang, H. S., Zhu, T. & Vulpe, C. (2003) Expression profiles of Arabidopsis thaliana in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis, *J Biol Chem.* **278**, 47644-53.
43. Sancenon, V., Puig, S., Mateu-Andres, I., Dorcey, E., Thiele, D. J. & Penarrubia, L. (2004) The Arabidopsis copper transporter COPT1 functions in root elongation and pollen development, *J Biol Chem.* **279**, 15348-55.
44. Andres-Colas, N., Sancenon, V., Rodriguez-Navarro, S., Mayo, S., Thiele, D. J., Ecker, J. R., Puig, S. & Penarrubia, L. (2006) The Arabidopsis heavy metal P-type ATPase HMA5 interacts with metallochaperones and functions in copper detoxification of roots, *Plant J.* **45**, 225-36.
45. Boutigny, S., Sautron, E., Finazzi, G., Rivasseau, C., Frelet-Barrand, A., Pilon, M., Rolland, N. & Seigneurin-Berny, D. (2014) HMA1 and PAA1, two chloroplast-envelope PIB-ATPases, play distinct roles in chloroplast copper homeostasis, *J Exp Bot.* **65**, 1529-40.
46. Jung, H. I., Gayomba, S. R., Rutzke, M. A., Craft, E., Kochian, L. V. & Vatamaniuk, O. K. (2012) COPT6 is a plasma membrane transporter that functions in copper homeostasis in Arabidopsis and is a novel target of SQUAMOSA promoter-binding protein-like 7, *J Biol Chem.* **287**, 33252-67.
47. Lee, J., Pena, M. M., Nose, Y. & Thiele, D. J. (2002) Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1, *J Biol Chem.* **277**, 4380-7.
48. Kampfenkel, K., Kushnir, S., Babiychuk, E., Inze, D. & Van Montagu, M. (1995) Molecular characterization of a putative Arabidopsis thaliana copper transporter and its yeast homologue, *J Biol Chem.* **270**, 28479-86.
49. Yamasaki, H., Hayashi, M., Fukazawa, M., Kobayashi, Y. & Shikanai, T. (2009) SQUAMOSA Promoter Binding Protein-Like7 Is a Central Regulator for Copper Homeostasis in Arabidopsis, *Plant Cell.* **21**, 347-61.

50. Garcia-Molina, A., Andres-Colas, N., Perea-Garcia, A., Neumann, U., Dodani, S. C., Huijser, P., Penarrubia, L. & Puig, S. (2013) The Arabidopsis COPT6 transport protein functions in copper distribution under copper-deficient conditions, *Plant Cell Physiol.* **54**, 1378-90.
51. Bock, K. W., Honys, D., Ward, J. M., Padmanaban, S., Nawrocki, E. P., Hirschi, K. D., Twell, D. & Sze, H. (2006) Integrating membrane transport with male gametophyte development and function through transcriptomics, *Plant Physiol.* **140**, 1151-68.
52. Andres-Colas, N., Carrio-Segui, A., Abdel-Ghany, S. E., Pilon, M. & Penarrubia, L. (2018) Expression of the Intracellular COPT3-Mediated Cu Transport Is Temporally Regulated by the TCP16 Transcription Factor, *Front Plant Sci.* **9**, 910.
53. Puig, S., Lee, J., Lau, M. & Thiele, D. J. (2002) Biochemical and genetic analyses of yeast and human high affinity copper transporters suggest a conserved mechanism for copper uptake, *J Biol Chem.* **277**, 26021-30.
54. Garcia-Molina, A., Andres-Colas, N., Perea-Garcia, A., Del Valle-Tascon, S., Penarrubia, L. & Puig, S. (2011) The intracellular Arabidopsis COPT5 transport protein is required for photosynthetic electron transport under severe copper deficiency, *Plant J.* **65**, 848-60.
55. Klaumann, S., Nickolaus, S. D., Furst, S. H., Starck, S., Schneider, S., Ekkehard Neuhaus, H. & Trentmann, O. (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.
56. Marschner, H. (1995) *Mineral nutrition of higher plants*, Academic press.
57. Weigel, M., Varotto, C., Pesaresi, P., Finazzi, G., Rappaport, F., Salamini, F. & Leister, D. (2003) Plastocyanin is indispensable for photosynthetic electron flow in Arabidopsis thaliana, *J Biol Chem.* **278**, 31286-9.
58. Pufahl, R. A., Singer, C. P., Peariso, K. L., Lin, S. J., Schmidt, P. J., Fahrni, C. J., Culotta, V. C., Penner-Hahn, J. E. & O'Halloran, T. V. (1997) Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor Atx1, *Science.* **278**, 853-6.
59. Xiao, Z., Brose, J., Schimo, S., Ackland, S. M., La Fontaine, S. & Wedd, A. G. (2011) Unification of the copper(I) binding affinities of the metallo-chaperones Atx1, Atox1, and related proteins: detection probes and affinity standards, *J Biol Chem.* **286**, 11047-55.
60. Rae, T. D., Schmidt, P. J., Pufahl, R. A., Culotta, V. C. & O'Halloran, T. V. (1999) Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase, *Science.* **284**, 805-8.
61. Lamb, A. L., Wernimont, A. K., Pufahl, R. A., Culotta, V. C., O'Halloran, T. V. & Rosenzweig, A. C. (1999) Crystal structure of the copper chaperone for superoxide dismutase, *Nat Struct Biol.* **6**, 724-9.
62. Himelblau, E., Mira, H., Lin, S. J., Culotta, V. C., Penarrubia, L. & Amasino, R. M. (1998) Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene ATX1 from Arabidopsis, *Plant Physiol.* **117**, 1227-34.
63. Mira, H., Vilar, M., Esteve, V., Martinell, M., Kogan, M. J., Giralt, E., Salom, D., Mingarro, I., Penarrubia, L. & Perez-Paya, E. (2004) Ionic self-complementarity induces amyloid-like fibril formation in an isolated domain of a plant copper metallochaperone protein, *BMC Struct Biol.* **4**, 7.
64. Mira, H., Vilar, M., Perez-Paya, E. & Penarrubia, L. (2001) Functional and conformational properties of the exclusive C-domain from the Arabidopsis copper chaperone (CCH), *Biochem J.* **357**, 545-9.
65. Mira, H., Martinez-Garcia, F. & Penarrubia, L. (2001) Evidence for the plant-specific intercellular transport of the Arabidopsis copper chaperone CCH, *Plant J.* **25**, 521-8.

66. Hamza, I., Schaefer, M., Klomp, L. W. & Gitlin, J. D. (1999) Interaction of the copper chaperone HAH1 with the Wilson disease protein is essential for copper homeostasis, *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**, 13363-8.
67. Banci, L., Bertini, I., Cantini, F., Felli, I. C., Gonnelli, L., Hadjiliadis, N., Pierattelli, R., Rosato, A. & Voulgaris, P. (2006) The Atx1-Ccc2 complex is a metal-mediated protein-protein interaction, *Nat Chem Biol*. **2**, 367-8.
68. Multhaup, G., Strausak, D., Bissig, K. D. & Solioz, M. (2001) Interaction of the CopZ copper chaperone with the CopA copper ATPase of *Enterococcus hirae* assessed by surface plasmon resonance, *Biochem Biophys Res Commun*. **288**, 172-7.
69. Hoppen, C., Muller, L., Hansch, S., Uzun, B., Milic, D., Meyer, A. J., Weidtkamp-Peters, S. & Groth, G. (2019) Soluble and membrane-bound protein carrier mediate direct copper transport to the ethylene receptor family, *Sci Rep*. **9**, 10715.
70. Rosenzweig, A. C., Huffman, D. L., Hou, M. Y., Wernimont, A. K., Pufahl, R. A. & O'Halloran, T. V. (1999) Crystal structure of the Atx1 metallochaperone protein at 1.02 Å resolution, *Structure*. **7**, 605-17.
71. Williams, L. E. & Mills, R. F. (2005) P(1B)-ATPases--an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants, *Trends Plant Sci*. **10**, 491-502.
72. Arnesano, F., Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Molteni, E., Huffman, D. L. & O'Halloran, T. V. (2002) Metallochaperones and metal-transporting ATPases: a comparative analysis of sequences and structures, *Genome Res*. **12**, 255-71.
73. Wernimont, A. K., Huffman, D. L., Lamb, A. L., O'Halloran, T. V. & Rosenzweig, A. C. (2000) Structural basis for copper transfer by the metallochaperone for the Menkes/Wilson disease proteins, *Nat Struct Biol*. **7**, 766-771.
74. Lee, M., Cooray, N. D. G. & Maher, M. J. (2017) The crystal structures of a copper-bound metallochaperone from *Saccharomyces cerevisiae*, *J Inorg Biochem*. **177**, 368-374.
75. Kay, K. L., Zhou, L., Tenori, L., Bradley, J. M., Singleton, C., Kihlken, M. A., Ciofi-Baffoni, S. & Le Brun, N. E. (2017) Kinetic analysis of copper transfer from a chaperone to its target protein mediated by complex formation, *Chem Commun (Camb)*. **53**, 1397-1400.
76. Huffman, D. L. & O'Halloran, T. V. (2000) Energetics of copper trafficking between the Atx1 metallochaperone and the intracellular copper transporter, Ccc2, *J Biol Chem*. **275**, 18611-4.
77. Blaby-Haas, C. E., Padilla-Benavides, T., Stube, R., Arguello, J. M. & Merchant, S. S. (2014) Evolution of a plant-specific copper chaperone family for chloroplast copper homeostasis, *Proc Natl Acad Sci U S A*. **111**, E5480-7.
78. Huang, C. H., Kuo, W. Y., Weiss, C. & Jinn, T. L. (2012) Copper chaperone-dependent and -independent activation of three copper-zinc superoxide dismutase homologs localized in different cellular compartments in *Arabidopsis*, *Plant Physiol*. **158**, 737-46.
79. Shikanai, T., Muller-Moule, P., Munekage, Y., Niyogi, K. K. & Pilon, M. (2003) PAA1, a P-type ATPase of *Arabidopsis*, functions in copper transport in chloroplasts, *Plant Cell*. **15**, 1333-46.
80. Perry, J. J., Shin, D. S., Getzoff, E. D. & Tainer, J. A. (2010) The structural biochemistry of the superoxide dismutases, *Biochim Biophys Acta*. **1804**, 245-62.
81. Smith, M. W. & Doolittle, R. F. (1992) A comparison of evolutionary rates of the two major kinds of superoxide dismutase, *J Mol Evol*. **34**, 175-84.

82. Kliebenstein, D. J., Monde, R. A. & Last, R. L. (1998) Superoxide dismutase in Arabidopsis: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization, *Plant Physiol.* **118**, 637-50.
83. McCord, J. M. & Fridovich, I. (1969) Superoxide Dismutase: AN ENZYMIC FUNCTION FOR ERYTHROCUPREIN (HEMOCUPREIN), *J Biol Chem.* **244**, 6049-6055.
84. Shin, D. S., Didonato, M., Barondeau, D. P., Hura, G. L., Hitomi, C., Berglund, J. A., Getzoff, E. D., Cary, S. C. & Tainer, J. A. (2009) Superoxide dismutase from the eukaryotic thermophile *Alvinella pompejana*: structures, stability, mechanism, and insights into amyotrophic lateral sclerosis, *J Mol Biol.* **385**, 1534-55.
85. Abdel-Ghany, S. E., Burkhead, J. L., Gogolin, K. A., Andres-Colas, N., Bodecker, J. R., Puig, S., Penarrubia, L. & Pilon, M. (2005) AtCCS is a functional homolog of the yeast copper chaperone Ccs1/Lys7, *FEBS Lett.* **579**, 2307-12.
86. Casareno, R. L., Waggoner, D. & Gitlin, J. D. (1998) The copper chaperone CCS directly interacts with copper/zinc superoxide dismutase, *J Biol Chem.* **273**, 23625-8.
87. Culotta, V. C., Klomp, L. W., Strain, J., Casareno, R. L., Krems, B. & Gitlin, J. D. (1997) The copper chaperone for superoxide dismutase, *J Biol Chem.* **272**, 23469-72.
88. Lamb, A. L., Torres, A. S., O'Halloran, T. V. & Rosenzweig, A. C. (2001) Heterodimeric structure of superoxide dismutase in complex with its metallochaperone, *Nat Struct Biol.* **8**, 751-5.
89. Beers, J., Glerum, D. M. & Tzagoloff, A. (1997) Purification, characterization, and localization of yeast Cox17p, a mitochondrial copper shuttle, *J Biol Chem.* **272**, 33191-6.
90. Carr, H. S. & Winge, D. R. (2003) Assembly of Cytochrome c Oxidase within the Mitochondrion, *Acc Chem Res.* **36**, 309-316.
91. Pacheu-Grau, D., Bareth, B., Dudek, J., Juris, L., Vogtle, F. N., Wissel, M., Leary, S. C., Dennerlein, S., Rehling, P. & Deckers, M. (2015) Cooperation between COA6 and SCO2 in COX2 maturation during cytochrome c oxidase assembly links two mitochondrial cardiomyopathies, *Cell Metab.* **21**, 823-33.
92. Khalimonchuk, O. & Winge, D. R. (2008) Function and redox state of mitochondrial localized cysteine-rich proteins important in the assembly of cytochrome c oxidase, *Biochim Biophys Acta.* **1783**, 618-28.
93. Heaton, D., Nittis, T., Srinivasan, C. & Winge, D. R. (2000) Mutational analysis of the mitochondrial copper metallochaperone Cox17, *J Biol Chem.* **275**, 37582-7.
94. Jozefczak, M., Remans, T., Vangronsveld, J. & Cuypers, A. (2012) Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses, *Int J Mol Sci.* **13**, 3145-3175.
95. Mah, V. & Jalilvand, F. (2012) Lead(II) complex formation with glutathione, *Inorg Chem.* **51**, 6285-98.
96. Vergauwen, B., De Vos, D. & Van Beeumen, J. J. (2006) Characterization of the bifunctional gamma-glutamate-cysteine ligase/glutathione synthetase (GshF) of *Pasteurella multocida*, *J Biol Chem.* **281**, 4380-94.
97. Freedman, J. H., Ciriolo, M. R. & Peisach, J. (1989) The Role of Glutathione in Copper Metabolism and Toxicity, *J Biol Chem.* **264**, 5598-5605.
98. Miras, R., Morin, I., Jacquin, O., Cuillel, M., Guillain, F. & Mintz, E. (2008) Interplay between glutathione, Atx1 and copper. 1. Copper(I) glutathionate induced dimerization of Atx1, *J Biol Inorg Chem.* **13**, 195-205.

99. Grill, E., Löffler, S., Winnacker, E. L. & Zenk, M. H. (1989) Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase), *Proc Natl Acad Sci U S A.* **86**, 6838-42.
100. Kneer, R. & Zenk, M. H. (1997) The formation of Cd-phytochelatin complexes in plant cell cultures, *Phytochemistry.* **44**, 69-74.
101. Mehra, R. K. & Winge, D. R. (1988) Cu(I) binding to the *Schizosaccharomyces pombe* gamma-glutamyl peptides varying in chain lengths, *Arch Biochem Biophys.* **265**, 381-9.
102. Scarano, G. & Morelli, E. (2002) Characterization of cadmium- and lead-phytochelatin complexes formed in a marine microalga in response to metal exposure, *BioMetals.* **15**, 145-51.
103. Jacquart, A., Brayner, R., El Hage Chahine, J. M. & Ha-Duong, N. T. (2017) Cd(2+) and Pb(2+) complexation by glutathione and the phytochelatins, *Chem Biol Interact.* **267**, 2-10.
104. Watly, J., Luczkowski, M., Padjasek, M. & Krezel, A. (2021) Phytochelatins as a Dynamic System for Cd(II) Buffering from the Micro- to Femtomolar Range, *Inorg Chem.* **60**, 4657-4675.
105. Winge, D. R., Nielson, K. B., Gray, W. R. & Hamer, D. H. (1985) Yeast metallothionein. Sequence and metal-binding properties, *J Biol Chem.* **260**, 14464-70.
106. M, R. B., Yookongkaew, N., Meetam, M., Guo, W. J., Punyasuk, N., AbuQamar, S. & Goldsbrough, P. (2014) Metallothionein deficiency impacts copper accumulation and redistribution in leaves and seeds of *Arabidopsis*, *New Phytol.* **202**, 940-951.
107. Guo, W. J., Bundithya, W. & Goldsbrough, P. B. (2003) Characterization of the *Arabidopsis* metallothionein gene family: tissue-specific expression and induction during senescence and in response to copper, *New Phytol.* **159**, 369-381.
108. Cobbett, C. & Goldsbrough, P. (2002) Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis, *Annu Rev Plant Biol.* **53**, 159-82.
109. Cobbett, C. S. (2000) Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification, *Plant Physiol.* **123**, 825-32.
110. Moller, J. V., Juul, B. & le Maire, M. (1996) Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases, *Biochim Biophys Acta.* **1286**, 1-51.
111. Axelsen, K. B. & Palmgren, M. G. (1998) Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily, *J Mol Evol.* **46**, 84-101.
112. Axelsen, K. B. & Palmgren, M. G. (2001) Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* **126**, 696-706.
113. Kim, Y. Y., Choi, H., Segami, S., Cho, H. T., Martinoia, E., Maeshima, M. & Lee, Y. (2009) AtHMA1 contributes to the detoxification of excess Zn(II) in *Arabidopsis*, *Plant J.* **58**, 737-53.
114. Moreno, I., Norambuena, L., Maturana, D., Toro, M., Vergara, C., Orellana, A., Zurita-Silva, A. & Ordenes, V. R. (2008) AtHMA1 is a thapsigargin-sensitive Ca²⁺/heavy metal pump, *J Biol Chem.* **283**, 9633-41.
115. Abdel-Ghany, S. E., Muller-Moule, P., Niyogi, K. K., Pilon, M. & Shikanai, T. (2005) Two P-type ATPases are required for copper delivery in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts, *Plant Cell.* **17**, 1233-51.
116. Tapken, W., Ravet, K. & Pilon, M. (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.

117. Deng, F., Yamaji, N., Xia, J. & Ma, J. F. (2013) A member of the heavy metal P-type ATPase OsHMA5 is involved in xylem loading of copper in rice, *Plant Physiol.* **163**, 1353-62.
118. Woeste, K. E. & Kieber, J. J. (2000) A strong loss-of-function mutation in RAN1 results in constitutive activation of the ethylene response pathway as well as a rosette-lethal phenotype, *Plant Cell.* **12**, 443-55.
119. Hirayama, T., Kieber, J. J., Hirayama, N., Kogan, M., Guzman, P., Nourizadeh, S., Alonso, J. M., Dailey, W. P., Dancis, A. & Ecker, J. R. (1999) RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in Arabidopsis, *Cell.* **97**, 383-93.
120. Eren, E. & Arguello, J. M. (2004) Arabidopsis HMA2, a divalent heavy metal-transporting P(IB)-type ATPase, is involved in cytoplasmic Zn²⁺ homeostasis, *Plant Physiol.* **136**, 3712-23.
121. Hussain, D., Haydon, M. J., Wang, Y., Wong, E., Sherson, S. M., Young, J., Camakaris, J., Harper, J. F. & Cobbett, C. S. (2004) P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in Arabidopsis, *Plant Cell.* **16**, 1327-39.
122. Verret, F., Gravot, A., Auroy, P., Leonhardt, N., David, P., Nussaume, L., Vavasseur, A. & Richaud, P. (2004) Overexpression of AtHMA4 enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance, *FEBS Lett.* **576**, 306-12.
123. Morel, M., Crouzet, J., Gravot, A., Auroy, P., Leonhardt, N., Vavasseur, A. & Richaud, P. (2009) AtHMA3, a P1B-ATPase allowing Cd/Zn/Co/Pb vacuolar storage in Arabidopsis, *Plant Physiol.* **149**, 894-904.
124. Arguello, J. M., Eren, E. & Gonzalez-Guerrero, M. (2007) The structure and function of heavy metal transport P1B-ATPases, *BioMetals.* **20**, 233-48.
125. Smith, A. T., Smith, K. P. & Rosenzweig, A. C. (2014) Diversity of the metal-transporting P1B-type ATPases, *J Biol Inorg Chem.* **19**, 947-60.
126. Kuhlbrandt, W. (2004) Biology, structure and mechanism of P-type ATPases, *Nat Rev Mol Cell Biol.* **5**, 282-95.
127. Jorgensen, P. L., Hakansson, K. O. & Karlsh, S. J. (2003) Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions, *Annu Rev Physiol.* **65**, 817-49.
128. Albers, R. W. (1967) Biochemical aspects of active transport, *Annu Rev Biochem.* **36**, 727-56.
129. Post, R. L., Kume, S., Tobin, T., Orcutt, B. & Sen, A. K. (1969) Flexibility of an active center in sodium-plus-potassium adenosine triphosphatase, *J Gen Physiol.* **54**, 306-26.
130. Vulpe, C., Levinson, B., Whitney, S., Packman, S. & Gitschier, J. (1993) Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase, *Nat Genet.* **3**, 7-13.
131. Chelly, J., Tumer, Z., Tonnesen, T., Petterson, A., Ishikawa-Brush, Y., Tommerup, N., Horn, N. & Monaco, A. P. (1993) Isolation of a candidate gene for Menkes disease that encodes a potential heavy metal binding protein, *Nat Genet.* **3**, 14-9.
132. Voskoboinik, I., Strausak, D., Greenough, M., Brooks, H., Petris, M., Smith, S., Mercer, J. F. & Camakaris, J. (1999) Functional analysis of the N-terminal CXXC metal-binding motifs in the human Menkes copper-transporting P-type ATPase expressed in cultured mammalian cells, *J Biol Chem.* **274**, 22008-12.
133. Huster, D. & Lutsenko, S. (2003) The distinct roles of the N-terminal copper-binding sites in regulation of catalytic activity of the Wilson's disease protein, *J Biol Chem.* **278**, 32212-8.

134. Singleton, C. & Le Brun, N. E. (2007) Atx1-like chaperones and their cognate P-type ATPases: copper-binding and transfer, *BioMetals*. **20**, 275-89.
135. Walker, J. M., Tsivkovskii, R. & Lutsenko, S. (2002) Metallochaperone Atox1 transfers copper to the NH₂-terminal domain of the Wilson's disease protein and regulates its catalytic activity, *J Biol Chem*. **277**, 27953-9.
136. Sharma, S. & Rosato, A. (2009) Role of the N-terminal tail of metal-transporting P(1B)-type ATPases from genome-wide analysis and molecular dynamics simulations, *J Chem Inf Model*. **49**, 76-83.
137. Salustros, N., Gronberg, C., Abeyrathna, N. S., Lyu, P., Oradd, F., Wang, K., Andersson, M., Meloni, G. & Gourdon, P. (2022) Structural basis of ion uptake in copper-transporting P(1B)-type ATPases, *Nat Commun*. **13**, 5121.
138. McAuliffe, C. (1966) Solubility in Water of Paraffin, Cycloparaffin, Olefin, Acetylene, Cycloolefin, and Aromatic Hydrocarbons¹, *The Journal of Physical Chemistry*. **70**, 1267-1275.
139. Girardin, J. (1864) Einfluss des Leuchtgases auf die Promenaden und Strassenbaume, *Jahresb Agrikultur*. **7**, 199-200.
140. Neljubow, D. (1901) Uber die horizontale Nutation der Stengel von Pisum Sativum und einiger anderen Pflanzen, *Bot Centralbl Beih*. **10**, 128-139.
141. Guzman, P. & Ecker, J. R. (1990) Exploiting the triple response of Arabidopsis to identify ethylene-related mutants, *Plant Cell*. **2**, 513-23.
142. Gane, R. (1934) Production of Ethylene by Some Ripening Fruits, *Nature*. **134**, 1008-1008.
143. Satoh, S., Takeda, Y. & Esashi, Y. (1984) Dormancy and Impotency of Cocklebur Seeds. IX. Changes in ACC—Ethylene Conversion Activity and ACC Content of Dormant and Nondormant Seeds during Soaking, *J Exp Bot*. **35**, 1515-1524.
144. Abeles, F. B., Morgan, P. W. & Saltveit Jr, M. E. (2012) *Ethylene in plant biology*, Academic press.
145. Ecker, J. R. & Davis, R. W. (1987) Plant defense genes are regulated by ethylene, *Proc Natl Acad Sci U S A*. **84**, 5202-6.
146. Du, H., Wu, N., Cui, F., You, L., Li, X. & Xiong, L. (2014) A homolog of ETHYLENE OVERPRODUCER, OsETOL1, differentially modulates drought and submergence tolerance in rice, *Plant J*. **78**, 834-49.
147. Barry, C. S. & Giovannoni, J. J. (2007) Ethylene and Fruit Ripening, *J Plant Growth Regul*. **26**, 143-159.
148. Watkins, C. B. (2006) The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables, *Biotechnol Adv*. **24**, 389-409.
149. Chen, Y. F., Randlett, M. D., Findell, J. L. & Schaller, G. E. (2002) Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of Arabidopsis, *J Biol Chem*. **277**, 19861-6.
150. Li, W., Ma, M., Feng, Y., Li, H., Wang, Y., Ma, Y., Li, M., An, F. & Guo, H. (2015) EIN2-directed translational regulation of ethylene signaling in Arabidopsis, *Cell*. **163**, 670-83.
151. Yang, Y., Hao, C., Du, J., Xu, L., Guo, Z., Li, D., Cai, H., Guo, H. & Li, L. (2022) The carboxy terminal transmembrane domain of SPL7 mediates interaction with RAN1 at the endoplasmic reticulum to regulate ethylene signalling in Arabidopsis, *New Phytol*. **236**, 878-892.
152. Hua, J. & Meyerowitz, E. M. (1998) Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in Arabidopsis thaliana, *Cell*. **94**, 261-71.

153. Alonso, J. M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S. & Ecker, J. R. (1999) EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis, *Science*. **284**, 2148-52.
154. Clark, K. L., Larsen, P. B., Wang, X. & Chang, C. (1998) Association of the Arabidopsis CTR1 Raf-like kinase with the ETR1 and ERS ethylene receptors, *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**, 5401-6.
155. Kieber, J. J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldmann, K. A. & Ecker, J. R. (1993) CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the raf family of protein kinases, *Cell*. **72**, 427-41.
156. Voet-van-Vormizeele, J. & Groth, G. (2008) Ethylene controls autophosphorylation of the histidine kinase domain in ethylene receptor ETR1, *Mol Plant*. **1**, 380-7.
157. Gao, Z., Chen, Y. F., Randlett, M. D., Zhao, X. C., Findell, J. L., Kieber, J. J. & Schaller, G. E. (2003) Localization of the Raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of Arabidopsis through participation in ethylene receptor signaling complexes, *J Biol Chem*. **278**, 34725-32.
158. Ju, C., Yoon, G. M., Shemansky, J. M., Lin, D. Y., Ying, Z. I., Chang, J., Garrett, W. M., Kessenbrock, M., Groth, G., Tucker, M. L., Cooper, B., Kieber, J. J. & Chang, C. (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.
159. Qiao, H., Chang, K. N., Yazaki, J. & Ecker, J. R. (2009) Interplay between ethylene, ETP1/ETP2 F-box proteins, and degradation of EIN2 triggers ethylene responses in Arabidopsis, *Genes Dev*. **23**, 512-21.
160. Binder, B. M., Walker, J. M., Gagne, J. M., Emborg, T. J., Hemmann, G., Bleecker, A. B. & Vierstra, R. D. (2007) The Arabidopsis EIN3 binding F-Box proteins EBF1 and EBF2 have distinct but overlapping roles in ethylene signaling, *Plant Cell*. **19**, 509-23.
161. Konishi, M. & Yanagisawa, S. (2008) Ethylene signaling in Arabidopsis involves feedback regulation via the elaborate control of EBF2 expression by EIN3, *Plant J*. **55**, 821-31.
162. Bisson, M. M. & Groth, G. (2011) New paradigm in ethylene signaling: EIN2, the central regulator of the signaling pathway, interacts directly with the upstream receptors, *Plant Signal Behav*. **6**, 164-6.
163. Fu, L., Liu, Y., Qin, G., Wu, P., Zi, H., Xu, Z., Zhao, X., Wang, Y., Li, Y., Yang, S., Peng, C., Wong, C. C. L., Yoo, S. D., Zuo, Z., Liu, R., Cho, Y. H. & Xiong, Y. (2021) The TOR-EIN2 axis mediates nuclear signalling to modulate plant growth, *Nature*. **591**, 288-292.
164. Bisson, M. M. & Groth, G. (2010) New insight in ethylene signaling: autokinase activity of ETR1 modulates the interaction of receptors and EIN2, *Mol Plant*. **3**, 882-9.
165. Bisson, M. M. & Groth, G. (2015) Targeting Plant Ethylene Responses by Controlling Essential Protein-Protein Interactions in the Ethylene Pathway, *Mol Plant*. **8**, 1165-74.
166. Wen, X., Zhang, C., Ji, Y., Zhao, Q., He, W., An, F., Jiang, L. & Guo, H. (2012) Activation of ethylene signaling is mediated by nuclear translocation of the cleaved EIN2 carboxyl terminus, *Cell Res*. **22**, 1613-6.
167. Qiao, H., Shen, Z., Huang, S. S., Schmitz, R. J., Urich, M. A., Briggs, S. P. & Ecker, J. R. (2012) Processing and subcellular trafficking of ER-tethered EIN2 control response to ethylene gas, *Science*. **338**, 390-3.
168. Olmedo, G., Guo, H., Gregory, B. D., Nourizadeh, S. D., Aguilar-Henonin, L., Li, H., An, F., Guzman, P. & Ecker, J. R. (2006) ETHYLENE-INSENSITIVE5 encodes a 5'→3' exoribonuclease required for regulation of the EIN3-targeting F-box proteins EBF1/2, *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**, 13286-93.

169. Potuschak, T., Vansiri, A., Binder, B. M., Lechner, E., Vierstra, R. D. & Genschik, P. (2006) The exoribonuclease XRN4 is a component of the ethylene response pathway in Arabidopsis, *Plant Cell*. **18**, 3047-57.
170. An, F., Zhao, Q., Ji, Y., Li, W., Jiang, Z., Yu, X., Zhang, C., Han, Y., He, W., Liu, Y., Zhang, S., Ecker, J. R. & Guo, H. (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.
171. Bleeker, A. B., Estelle, M. A., Somerville, C. & Kende, H. (1988) Insensitivity to Ethylene Conferred by a Dominant Mutation in Arabidopsis thaliana, *Science*. **241**, 1086-9.
172. Hua, J., Chang, C., Sun, Q. & Meyerowitz, E. M. (1995) Ethylene insensitivity conferred by Arabidopsis ERS gene, *Science*. **269**, 1712-4.
173. Hua, J., Sakai, H., Nourizadeh, S., Chen, Q. G., Bleeker, A. B., Ecker, J. R. & Meyerowitz, E. M. (1998) EIN4 and ERS2 are members of the putative ethylene receptor gene family in Arabidopsis, *Plant Cell*. **10**, 1321-32.
174. Sakai, H., Hua, J., Chen, Q. G., Chang, C., Medrano, L. J., Bleeker, A. B. & Meyerowitz, E. M. (1998) ETR2 is an ETR1-like gene involved in ethylene signaling in Arabidopsis, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **95**, 5812-5817.
175. Bleeker, A. B., Esch, J. J., Hall, A. E., Rodriguez, F. I. & Binder, B. M. (1998) The ethylene-receptor family from Arabidopsis: structure and function, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. **353**, 1405-12.
176. Chen, Y. F., Shakeel, S. N., Bowers, J., Zhao, X. C., Etheridge, N. & Schaller, G. E. (2007) Ligand-induced degradation of the ethylene receptor ETR2 through a proteasome-dependent pathway in Arabidopsis, *J Biol Chem*. **282**, 24752-8.
177. Schott-Verdugo, S., Muller, L., Classen, E., Gohlke, H. & Groth, G. (2019) Structural Model of the ETR1 Ethylene Receptor Transmembrane Sensor Domain, *Sci Rep*. **9**, 8869.
178. Chang, C., Kwok, S. F., Bleeker, A. B. & Meyerowitz, E. M. (1993) Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators, *Science*. **262**, 539-44.
179. Moussatche, P. & Klee, H. J. (2004) Autophosphorylation activity of the Arabidopsis ethylene receptor multigene family, *J Biol Chem*. **279**, 48734-41.
180. Hall, B. P., Shakeel, S. N., Amir, M., Ul-Haq, N., Qu, X. & Schaller, G. E. (2012) Histidine kinase activity of the ethylene receptor ETR1 facilitates the ethylene response in Arabidopsis, *Plant Physiol*. **159**, 682-95.
181. Schaller, G. E., Ladd, A. N., Lanahan, M. B., Spanbauer, J. M. & Bleeker, A. B. (1995) The ethylene response mediator ETR1 from Arabidopsis forms a disulfide-linked dimer, *J Biol Chem*. **270**, 12526-30.
182. Gao, Z., Wen, C. K., Binder, B. M., Chen, Y. F., Chang, J., Chiang, Y. H., Kerris, R. J., 3rd, Chang, C. & Schaller, G. E. (2008) Heteromeric interactions among ethylene receptors mediate signaling in Arabidopsis, *J Biol Chem*. **283**, 23801-10.
183. Chen, Y. F., Gao, Z., Kerris, R. J., 3rd, Wang, W., Binder, B. M. & Schaller, G. E. (2010) Ethylene receptors function as components of high-molecular-mass protein complexes in Arabidopsis, *PLoS One*. **5**, e8640.
184. Azhar, B. J., Zulfiqar, A., Shakeel, S. N. & Schaller, G. E. (2020) Amplification and adaptation in the ethylene signaling pathway, *Small Methods*. **4**, 1900452.

185. Hoppen, C. & Groth, G. (2020) Novel insights into the transfer routes of the essential copper cofactor to the ethylene plant hormone receptor family, *Plant Signal Behav.* **15**, 1716512.
186. Tanchou, V., Gas, F., Urvoas, A., Cougouluegne, F., Ruat, S., Averseng, O. & Quemeneur, E. (2004) Copper-mediated homo-dimerisation for the HAH1 metallochaperone, *Biochem Biophys Res Commun.* **325**, 388-94.
187. Meyer, A. J., Brach, T., Marty, L., Kreye, S., Rouhier, N., Jacquot, J. P. & Hell, R. (2007) Redox-sensitive GFP in *Arabidopsis thaliana* is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer, *Plant J.* **52**, 973-86.
188. Anastassopoulou, I., Banci, L., Bertini, I., Cantini, F., Katsari, E. & Rosato, A. (2004) Solution structure of the apo and copper(I)-loaded human metallochaperone HAH1, *Biochemistry.* **43**, 13046-53.
189. Arnesano, F., Banci, L., Bertini, I., Huffman, D. L. & O'Halloran, T. V. (2001) Solution structure of the Cu(I) and apo forms of the yeast metallochaperone, Atx1, *Biochemistry.* **40**, 1528-39.
190. Banci, L., Bertini, I., Del Conte, R., Markey, J. & Ruiz-Duenas, F. J. (2001) Copper trafficking: the solution structure of *Bacillus subtilis* CopZ, *Biochemistry.* **40**, 15660-8.
191. Boncella, A. E., Shattuck, J. E., Cascarina, S. M., Paul, K. R., Baer, M. H., Fomicheva, A., Lamb, A. K. & Ross, E. D. (2020) Composition-based prediction and rational manipulation of prion-like domain recruitment to stress granules, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **117**, 5826-5835.
192. Mirdita, M., Schutze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S. & Steinegger, M. (2022) ColabFold: making protein folding accessible to all, *Nat Methods.* **19**, 679-682.
193. Levy, A. R., Turgeman, M., Gevorkyan-Aiapetov, L. & Ruthstein, S. (2017) The structural flexibility of the human copper chaperone Atox1: Insights from combined pulsed EPR studies and computations, *Protein Sci.* **26**, 1609-1618.
194. Perkal, O., Qasem, Z., Turgeman, M., Schwartz, R., Gevorkyan-Airapetov, L., Pavlin, M., Magistrato, A., Major, D. T. & Ruthstein, S. (2020) Cu(I) Controls Conformational States in Human Atox1 Metallochaperone: An EPR and Multiscale Simulation Study, *J Phys Chem B.* **124**, 4399-4411.
195. Huynh, K. & Partch, C. L. (2015) Analysis of protein stability and ligand interactions by thermal shift assay, *Curr Protoc Protein Sci.* **79**, 28 9 1-28 9 14.
196. Ortega-Alarcon, D., Claveria-Gimeno, R., Vega, S., Jorge-Torres, O. C., Esteller, M., Abian, O. & Velazquez-Campoy, A. (2021) Stabilization Effect of Intrinsically Disordered Regions on Multidomain Proteins: The Case of the Methyl-CpG Protein 2, MeCP2, *Biomolecules.* **11**.
197. Ortega-Alarcon, D., Claveria-Gimeno, R., Vega, S., Jorge-Torres, O. C., Esteller, M., Abian, O. & Velazquez-Campoy, A. (2021) Influence of the disordered domain structure of MeCP2 on its structural stability and dsDNA interaction, *Int J Biol Macromol.* **175**, 58-66.
198. Claveria-Gimeno, R., Lanuza, P. M., Morales-Chueca, I., Jorge-Torres, O. C., Vega, S., Abian, O., Esteller, M. & Velazquez-Campoy, A. (2017) The intervening domain from MeCP2 enhances the DNA affinity of the methyl binding domain and provides an independent DNA interaction site, *Sci Rep.* **7**, 41635.

199. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Zidek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A. W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P. & Hassabis, D. (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold, *Nature*. **596**, 583-589.
200. Harrison, M. D., Jones, C. E. & Dameron, C. T. (1999) Copper chaperones: function, structure and copper-binding properties, *J Biol Inorg Chem*. **4**, 145-53.
201. Zimmermann, M., Clarke, O., Gulbis, J. M., Keizer, D. W., Jarvis, R. S., Cobbett, C. S., Hinds, M. G., Xiao, Z. & Wedd, A. G. (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.
202. Narindrasorasak, S., Zhang, X., Roberts, E. A. & Sarkar, B. (2004) Comparative analysis of metal binding characteristics of copper chaperone proteins, Atx1 and ATOX1, *Bioinorg Chem Appl*. **2**, 105-23.
203. Xie, Z. & Xu, J. (2022) Deep graph learning of inter-protein contacts, *Bioinformatics*. **38**, 947-953.
204. Uhlemann, E. E., Lee, W., Tonelli, M. & Dmitriev, O. Y. (2021) At sixes and sevens: cryptic domain in the metal binding chain of the human copper transporter ATP7A, *Biophys J*. **120**, 4600-4607.
205. Keller, A. M., Benitez, J. J., Klarin, D., Zhong, L., Goldfogel, M., Yang, F., Chen, T. Y. & Chen, P. (2012) Dynamic multibody protein interactions suggest versatile pathways for copper trafficking, *J Am Chem Soc*. **134**, 8934-43.
206. Fatemi, N., Korzhnev, D. M., Velyvis, A., Sarkar, B. & Forman-Kay, J. D. (2010) NMR characterization of copper-binding domains 4-6 of ATP7B, *Biochemistry*. **49**, 8468-77.
207. Bitter, R. M., Oh, S., Deng, Z., Rahman, S., Hite, R. K. & Yuan, P. (2022) Structure of the Wilson disease copper transporter ATP7B, *Sci Adv*. **8**, eab15508.
208. Arioiz, C., Li, Y. & Wittung-Stafshede, P. (2017) The six metal binding domains in human copper transporter, ATP7B: molecular biophysics and disease-causing mutations, *BioMetals*. **30**, 823-840.
209. Lorinczi, E., Tsivkovskii, R., Haase, W., Bamberg, E., Lutsenko, S. & Friedrich, T. (2008) Delivery of the Cu-transporting ATPase ATP7B to the plasma membrane in *Xenopus* oocytes, *Biochim Biophys Acta*. **1778**, 896-906.
210. Kokoszka, M. E. & Kay, B. K. (2015) Mapping protein-protein interactions with phage-displayed combinatorial peptide libraries and alanine scanning, *Methods Mol Biol*. **1248**, 173-88.
211. Whittaker, J., Groth, A. V., Mynarcik, D. C., Pluzek, L., Gadsboll, V. L. & Whittaker, L. J. (2001) Alanine scanning mutagenesis of a type 1 insulin-like growth factor receptor ligand binding site, *J Biol Chem*. **276**, 43980-6.
212. Cutsail, G., 3rd, Schott-Verdugo, S., Muller, L., DeBeer, S., Groth, G. & Gohlke, H. (2022) Spectroscopic and QM/MM studies of the Cu(I) binding site of the plant ethylene receptor ETR1, *Biophys J*. **121**, 3862-3873.
213. Schaller, G. E. & Bleecker, A. B. (1995) Ethylene-binding sites generated in yeast expressing the Arabidopsis ETR1 gene, *Science*. **270**, 1809-11.
214. Shanmugavel, K. P. & Wittung-Stafshede, P. (2019) Copper relay path through the N-terminus of Wilson disease protein, ATP7B, *Metallomics*. **11**, 1472-1480.

-
215. Lebendiker, M. & Danieli, T. (2011) Purification of proteins fused to maltose-binding protein, *Methods Mol Biol.* **681**, 281-93.
 216. Pavlin, M., Qasem, Z., Sameach, H., Gevorkyan-Airapetov, L., Ritacco, I., Ruthstein, S. & Magistrato, A. (2019) Unraveling the Impact of Cysteine-to-Serine Mutations on the Structural and Functional Properties of Cu(I)-Binding Proteins, *Int J Mol Sci.* **20**.
 217. Kotov, V., Bartels, K., Veith, K., Josts, I., Subhramanyam, U. K. T., Gunther, C., Labahn, J., Marlovits, T. C., Moraes, I., Tidow, H., Low, C. & Garcia-Alai, M. M. (2019) High-throughput stability screening for detergent-solubilized membrane proteins, *Sci Rep.* **9**, 10379.
 218. Carlson, M. L., Young, J. W., Zhao, Z., Fabre, L., Jun, D., Li, J., Li, J., Dhupar, H. S., Wason, I., Mills, A. T., Beatty, J. T., Klassen, J. S., Rouiller, I. & Duong, F. (2018) The Peptidisc, a simple method for stabilizing membrane proteins in detergent-free solution, *Elife.* **7**.
 219. Binder, B. M., Rodriguez, F. I., Bleecker, A. B. & Patterson, S. E. (2007) The effects of Group 11 transition metals, including gold, on ethylene binding to the ETR1 receptor and growth of *Arabidopsis thaliana*, *FEBS Lett.* **581**, 5105-9.
 220. Zhang, X., Walke, G. R., Horvath, I., Kumar, R., Blockhuys, S., Holgersson, S., Walton, P. H. & Wittung-Stafshede, P. (2022) Memo1 binds reduced copper ions, interacts with copper chaperone Atox1, and protects against copper-mediated redox activity in vitro, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **119**, e2206905119.
 221. Liang, F., Cunningham, K. W., Harper, J. F. & Sze, H. (1997) ECA1 complements yeast mutants defective in Ca²⁺ pumps and encodes an endoplasmic reticulum-type Ca²⁺-ATPase in *Arabidopsis thaliana*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**, 8579-84.

6 Danksagung

Besonders möchte ich mich an dieser Stelle bei Herrn Prof. Dr. Georg Groth für die Möglichkeit der Bearbeitung dieses interessanten und komplexen Themas bedanken. Auch danke ich Ihm für die zahlreichen fachlichen Diskussionen, Denkanstöße, die konstruktive Kritik und die stets offene Tür bei allen fachlichen und nicht-fachlichen Anliegen. Vielen Dank!

Herrn Prof. Dr. Lutz Schmitt möchte ich für die Übernahme der Position als Mentor sowie für seine Tätigkeiten im SFB1208 danken, in dessen Rahmen diese Promotion ermöglicht wurde.

Im Zusammenhang mit dem SFB1208 möchte ich mich auch bei Frau Dr. Cordula Kruse bedanken, ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Holger Gohlke und seinem Team, ganz besonders Lisa Sophie Kersten, für die erfolgreiche Zusammenarbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen langjährigen Kollegen/innen und Begleitern im Labor bedanken, mit denen ich ausgiebig über alle möglichen wissenschaftlichen und technischen Fragestellungen diskutieren konnte und die stets ein offenes Ohr für alle Anliegen hatten. Vielen Dank, Dr. Alexander Minges, Nicole und Kerstin. Ebenso möchte ich mich bei allen anderen Kollegen/innen für die gemeinsame Zeit bedanken.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern und Geschwistern bedanken, die mich immer unterstützt haben.

7 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. Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation, weder in dieser noch in ähnlicher Form, keiner anderen Fakultät oder Institution vorgelegt habe und dass ich keine vorherigen erfolglosen oder erfolgreichen Promotionsversuche unternommen habe.

Ort, Datum

Dominik Dluhosch