



Institut für Biochemie der Pflanzen
Abteilung für biochemische Pflanzenphysiologie

Bachelorarbeit

Molekulare Charakterisierung von RTE1 aus *Arabidopsis thaliana*

Zur Erlangung des Bachelorgrades
(Bachelor of Science - Biochemistry)

vorgelegt von

Alexander Ralph Michael Minges
(1804535)

im September 2010

Erstprüfer: Univ. Prof. Dr. G. Groth

Institut für Biochemie der Pflanzen
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Zweitprüfer: Univ. Prof. Dr. L. Schmitt

Institut für Biochemie
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	4
2	Einleitung	5
2.1	Das Phytohormon Ethylen	5
2.2	Ethylensignalweg	7
2.3	RTE1 im Ethylensignalweg	9
2.4	Zielsetzung	11
3	Material und Methoden	12
3.1	Material	12
3.1.1	Geräte und Hilfsmittel	12
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	13
3.1.3	Standards für Proteinbestimmung und SDS-PAGE	13
3.1.4	Chemikalien	13
3.1.5	Antibiotoka-Stammlösungen	14
3.1.6	Antikörper	15
3.1.7	Kommerzielle Kits	15
3.1.8	Bakterienstämme	15
3.1.9	Kulturmedien	15
3.1.10	Puffer und Lösungen für die native Reinigung	15
3.1.11	Puffer und Lösungen für die denaturierende Reinigung	16
3.1.12	Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE	16
3.1.13	Puffer und Lösungen für den Westernblot	17
3.1.14	Puffer und Lösungen für den Nachweis der Häminbindung	18
3.2	Methoden	19
3.2.1	Transformation in <i>E. coli</i>	19

3.2.2	Expression in <i>E. coli</i>	21
3.2.3	Zellaufschluss	21
3.2.4	Native Reinigung	21
3.2.5	Denaturierende Reinigung	22
3.2.6	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	23
3.2.7	Silberfärbung	24
3.2.8	Westernblot und immunologischer Nachweis von Proteinen	24
3.2.9	Proteinbestimmung über einen Bicinchoninsäure-Assay . .	25
3.2.10	Nachweis der Häminbindung	26
4	Ergebnisse	32
4.1	Native Reinigung von <i>REVERSION TO ETHYLENE 1</i> (RTE1)	32
4.2	Denaturierende Reinigung	34
4.3	Häminagarose-Assay	34
4.4	Photometrischer Bindungsassay	35
4.5	Fluoreszenzspektroskopie	40
4.6	Circulardichronismus (CD)-Spektroskopie	42
5	Diskussion	44
	Abbildungsverzeichnis	45
	Tabellenverzeichnis	46
	Literaturverzeichnis	47

1 Zusammenfassung

2 Einleitung

2.1 Das Phytohormon Ethylen

Ethylen (C_2H_4) ist ein gasförmiges Phytohormon, welches in höheren Pflanzen viele Aspekte von Entwicklung, Wachstum und Stressantwort reguliert (Kendrick u. Chang, 2008).

In vivo wird Ethylen aus der Aminosäure Methionin synthetisiert, welche über Adenosylmethionin (AdoMet) und 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC) in Ethylen umgewandelt wird. Dies geschieht unter ATP-Verbrauch im Cytoplasma, wobei der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, die Umwandlung von AdoMet zu ACC, von der ACC-Synthase katalysiert wird. Aus dem freiwerdenden 5'-Methylthioadenosin wird im Yang-Zyklus Methionin regeneriert (vgl. Abbildung 2.1).

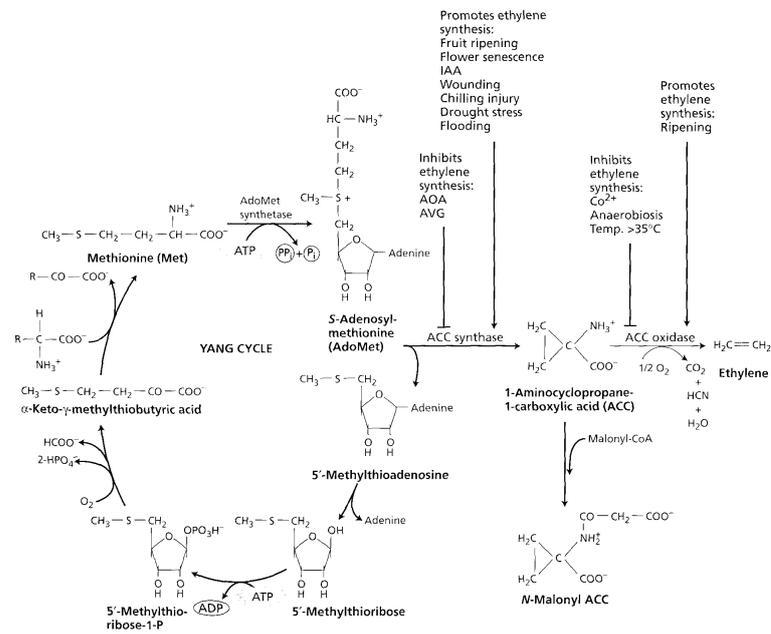


Abbildung 2.1: Ethylensynthese ausgehend von Methionin und Regeneration von Methionin im Yang-Zyklus (Taiz u. Zeiger, 2007)

2.2 Ethylensignalweg

Die Ethylenwahrnehmung geschieht über in die Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) integrierte Ethylenrezeptoren, welche dort Homo- und Heterodimere ausbilden können. Als kleines, hydrophobes Molekül kann Ethylen die Zellmembran durchqueren und bindet über den Kofaktor Kupfer innerhalb der Transmembrandomäne dieser Rezeptoren. Hierdurch wird die nachgeschaltete MAP-Kinase-Kinase *CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1* (CTR1) inaktiviert. Für die Lokalisierung des Kofaktors Kupfer zeichnet *RESPONSIVE TO ANTAGONIST 1* (RAN1), ein Kupfertransporter, verantwortlich. Hierdurch kann die Signalweiterleitung über *ETHYLENE INSENSITIVE 2* (EIN2) erfolgen. EIN2 selbst reguliert die von *ETHYLENE INSENSITIVE 3* (EIN3) und *ETHYLENE INSENSITIVE3 LIKE 1* (EIL1) initiierte Transkription des *ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1* (ERF1), welcher wiederum die Transkription von Ethylenantwortgenen induziert (vgl. Abbildung 2.2).

In *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) existieren fünf homologe Ethylenrezeptoren (ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 und EIN4) welche mit prokaryotischen Zwei-Komponenten-Histidinkinasen verwandt sind (Voet-van-Vormizeele u. Groth, 2008). Diese Rezeptoren zeigen eine funktionelle Redundanz und sind negative Regulatoren der Ethylenantwort (Resnick u. a., 2008).

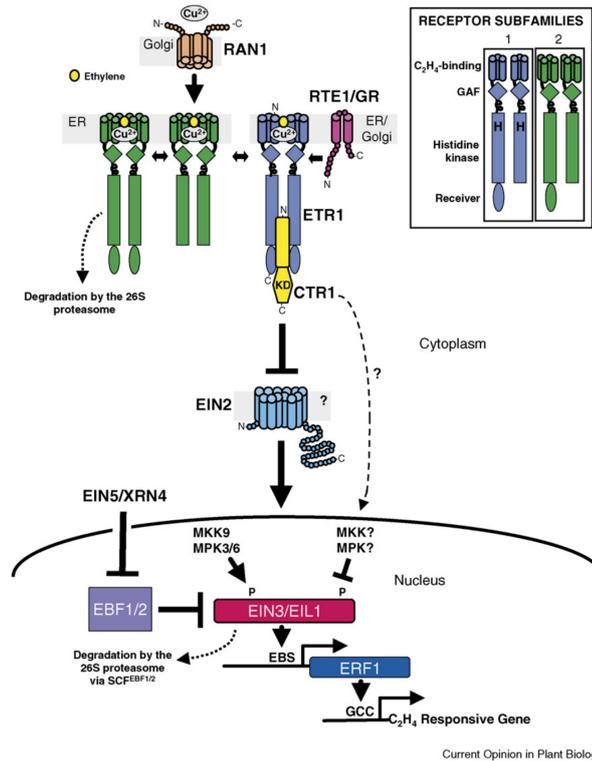


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Ethylen-Signalweges (Kendrick u. Chang, 2008)

2.3 RTE1 im Ethylensignalweg

Bei RTE1 handelt es sich um ein Homodimer, welches kolokalisiert mit *ETHYLENE RESISTANT 1* (ETR1) in der Membran des Golgi-Apparates bzw. des ER vorliegt (Resnick u. a., 2006). Entdeckt wurde es bei der Suche nach zusätzlichen Komponenten des Ethylensignalweges. Die Ethylen-insensitiven Mutante *etr1-2* zeigt bei Anwesenheit von Ethylen und Wachstum im Dunkeln *nicht* den üblichen Phänotyp der Dreifachantwort: Verdickung und Verkürzung des Hypokotyls, Hemmung des Wurzelwachstums und Krümmung des Apikalhakens. Bei *etr1-2* beruht die Insensitivität gegenüber Ethylen im Gegensatz zu *etr1-1* nicht auf dem Unvermögen den für die Ethylenbindung erforderlichen Kofaktor Kupfer zu binden, sondern auf der Blockade der Weiterleitung des Ethylensignals zur Signaldomäne des Rezeptors. Es wird vermutet, dass die auf die Ethylenbindung folgende Konformationsänderung verhindert wird. (Resnick u. a., 2008).

Durch Mutagenese wurden Individuen aus dieser *etr1-2*-Population erzeugt, welche wieder die Dreifachantwort *zeigten*. Durch Komplementierungsversuche wurden die Mutanten *rte1-1* und *rte1-2* als allelisch identifiziert. Da beide Mutanten eine Ethylenantwort ähnlich der des Wildtyps aufwiesen, konnte darauf geschlossen werden, dass ein funktionelles RTE1 für die Insensitivität der *etr1-2*-Mutanten notwendig ist. Folglich muss RTE1 zu einem frühen Zeitpunkt innerhalb des Ethylensignalweges gemeinsam mit ETR1 wirksam sein. Ein weiteres Allel *rte1-3* wurde nach Analyse der Gensequenz von RTE1 identifiziert. Alle RTE1-Mutanten zeigten einen ähnlichen Phänotyp, woraus geschlossen wurde, dass *rte1-1* und *rte1-2* *loss-of-function*-Allele darstellen. Bei *rte1-3* handelt es sich vermutlich um eine Nullmutation (Resnick u. a., 2006).

rte1-2 ist in der Lage, eine Reihe von Mutationen in ETR1 zu unterdrücken, beispielsweise *etr1-2*, allerdings nur bei Mutationen, welche die eigentliche Ethylenbindung nicht oder zumindest nicht vollständig verhindern (Resnick u. a., 2008).

Weitere Versuche zeigten, dass eine Überexpression von RTE1 im Wildtyp zu einer verminderten Ethylensensitivität führt, was die Annahme stützte, dass es sich bei RTE1 um einen negativen Regulator der Ethylenantwort handelt (Resnick u. a., 2006). Ebenso konnte durch die Analyse des Phänotyps von Doppel- und Dreifachmutanten mit *etr1-2*, *rte1-2* und *ran1-3* gezeigt werden, dass RTE1 unabhängig von

RAN1 auf die Ethylensignalkaskade wirkt (Resnick u. a., 2008). So ist die Funktion von ETR1 im Wildtyp sowohl von RTE1 als auch von RAN1 abhängig, *etr1-2* hingegen nur von RTE1. Hiervon ausgehend wurde das nachfolgend dargestellte Modell zum Signalzustand von ETR1 vorgeschlagen (Resnick u. a., 2008).

RTE1 reguliert die Ethylenantwort über eine Konformationsänderung der Ethylen-Bindedomäne des Rezeptors ETR1 (Abbildung 2.3). ETR1 geht hierbei von einer nicht-funktionellen Konformation mit Hilfe von RTE1 in eine funktionelle Konformation über, in welchem der Rezeptor sich in seinem „an“-Zustand befindet und die Ethylenantwort unterdrückt. In diesem Zustand kann nun auch Ethylen gebunden werden, wobei ETR1 in eine semi-stabile Konformation übergeht, welche ebenfalls den „an“-Zustand repräsentiert und schließlich durch eine Konformationsänderung in den „aus“-Zustand wechselt, wodurch die Ethylensignalkaskade ausgelöst wird. Der erneute Übergang in den „an“-Zustand kann wiederum nur mit Hilfe von RTE1 erfolgen (Resnick u. a., 2008).

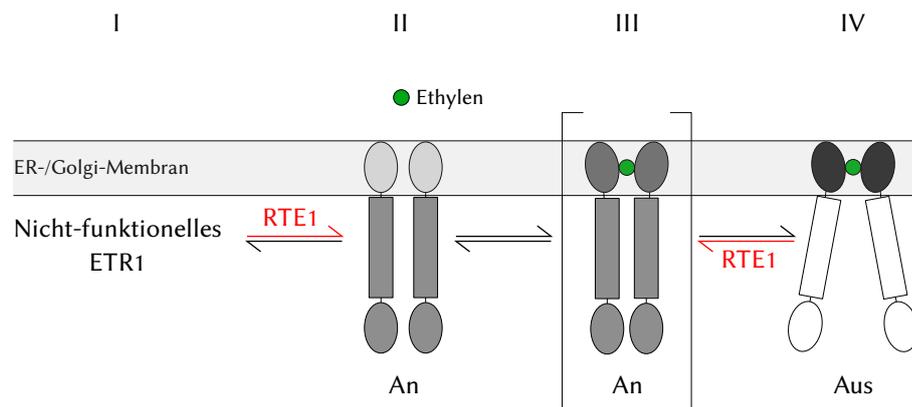


Abbildung 2.3: Modell des Signalzustandes von ETR1 (eigene Abbildung nach Resnick u. a., 2008)

RTE1 bewirkt den Übergang von ETR1 von einer nicht-funktionellen (I) in eine funktionelle Konformation (II). Diese spiegelt den „an“-Zustand des Rezeptors wider. Wird Ethylen gebunden, geht der Rezeptor in eine semi-stabile Konformation (III) über, welche ebenfalls noch dem „an“-Zustand entspricht. Aus dieser Konformation wechselt ETR1 in den „aus“-Zustand (IV). Der erneute Übergang in den „an“-Zustand erfolgt wiederum mit Hilfe von RTE1.

Homologe zu RTE1 wurden in einer Vielzahl weiterer Eukaryoten mit Ausnah-

me der Pilze gefunden, beispielsweise in *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* und *Plasmodium*. Das menschliche Homolog weist eine Sequenzidentität im Vergleich zu RTE1 aus *A. thaliana* von 40,5 % auf (Resnick u. a., 2006). Nach bisherigem Kenntnisstand verfügen die genannten Spezies über jeweils eine Kopie des Gens, mit Ausnahme von *A. thaliana*, bei welcher sich eine zweite Kopie – *RTE1-HOMOLOG* (RTH) – mit 51 % Sequenzidentität findet (Resnick u. a., 2006).

Abseits der Pflanzen ist keine biologische Funktion der RTE1-Homologe bekannt, noch weisen sie bekannte Sequenzmotive auf. Die Tatsache ihrer weit verbreiteten Existenz in einer Vielzahl von Spezies ohne Ethylenrezeptoren (Resnick u. a., 2008) lässt jedoch auf eine essenzielle, konservierte Funktion schließen (Resnick u. a., 2006). Durch Sequenz-Alignments konnten zwei hochkonservierte Abschnitte identifiziert werden, welche konservierte Cystein- und Histidinreste aufweisen (Cys⁵⁴, His⁷², Cys¹⁶¹). Bei *rte1-1* ist Cys¹⁶¹ durch ein Tyrosin ersetzt. Darüberhinaus zeigen sequenzbasierte Vorhersagen, dass pflanzliche RTE1-Homologe zwei bis vier Transmembrandomänen besitzen, eine nahe des N-Terminus sowie zwei bis drei am C-Terminus. In *rte1-2* sind durch einen von einer *missense*-Mutation hervorgerufenen *frameshift* die letzten 27 Aminosäurereste, welche sich in einer vorhergesagten Transmembrandomäne befinden, durch 15 inkorrekte Reste ersetzt worden, was vermutlich zu einer falschen Ausrichtung des Proteins in der Membran führt. Tierische Homologe zeigen in der Sequenzanalyse die ersten drei Transmembrandomänen (Resnick u. a., 2006).

2.4 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollten die molekularen Eigenschaften von RTE1 näher charakterisiert werden. Da für das humane Homolog von RTE1 eine Hämin-Bindung bereits nachgewiesen werden konnte (Chang, 2009), sollte der Fokus dieser Arbeit auf dem Nachweis und wenn möglich auch Quantifizierung einer Hämin-Bindung liegen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Hilfsmittel

Bezeichnung	Hersteller
Analysen-/Präzisionswaagen	Sartorius, Göttingen
Autoklav	Thermo Fisher Scientific, Bonn
Automatische Pipetten	Gilson, Bad Camberg JASCO Corp., Gross-Umstadt
CD-Spektrometer J-715	
DNA-Gelkammersystem PerfectBlue	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Elektroblotter PerfectBlue 'Semi-Dry'	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Fluoreszenzspektrometer LS 55	PerkinElmer, Rodgau
Hochdruckhomogenisator („French Press“)	Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Inkubationsschüttler INNOVA 44R	New Brunswick, Nürtigen
Kühlzentrifuge Avanti J-26 XP	Beckman Coulter, Krefeld
Kühlzentrifuge Eppendorf 5810 R	Eppendorf, Hamburg
LAS-4000 mini (Luminescent Image Analyser)	Fujifilm, Deutschland
Magnetrührer MR 3000/3001	Heidolph, Schwabach
Mikrozentrifuge Minispin	Eppendorf, Hamburg
Milli-Q-gradient Wasserfilteranlage	Millipore, Schwalbach
Minishaker MS 2	IKA, Staufen
Rotoren: JA-10, JA-25.50, Type 70.1 Ti	Beckman Coulter, Krefeld
Spectrophotometer DU 800	Beckman Coulter, Krefeld
Taumelschüttler Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Thermomixer compact/comfort	Eppendorf, Hamburg
Ultraschalldesintegrator Branson-Sonifier	Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Ultrazentrifuge Optima L-80 XP	Beckman Coulter, Krefeld

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Chromatographiepapier 3MM Chr	Whatman, Maidstone, UK
Falconröhrchen 15 mL und 50 mL	Greiner-Bio One, Frickenhausen
Größenausschlusschromatographie PD-10	GE-Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, SK
Halbmikroküvetten	Hartenstein, Würzburg
Hämin-Agarose	Sigma-Aldrich, München
Ni-IDA	Macherey-Nagel, Düren
Petrischalen	Hartenstein, Würzburg
Pipettenspitzen	Brand, Wertheim
Reaktionsgefäße 1,5 mL und 2 mL	Greiner-Bio One, Frickenhausen
Spritzenvorsatzfilter (0,2 µm)	Merck, Bruchsal

3.1.3 Standards für Proteinbestimmung und SDS-PAGE

Bezeichnung	Hersteller
BSA Standard for Protein Assay 2 mg mL ⁻¹	Qiagen, Hilden
Precision Plus Protein Standards Dual Color/Unstained	Bio-Rad, München

3.1.4 Chemikalien

Bezeichnung	CAS-Nummer	Hersteller
Agar		Becton Dickinson, Heidelberg
Ampicillin-Natriumsalz	69-52-3	AppliChem, Darmstadt
Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan (BisTris)	6976-37-0	Serva, Heidelberg
Borsäure	10043-35-3	Merck, Bruchsal
Bromphenolblau	62625-28-9	Sigma-Aldrich, München
Dikaliumhydrogenphosphat	16788-57-1	Grüssing, Filsum
Dinatriumhydrogenphosphat	10028-24-7	VWR, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	3483-12-3	Sigma-Aldrich, München
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	60-00-4	AppliChem, Darmstadt
Essigsäure	64-19-7	VWR, Darmstadt
Ethanol	64-17-5	VWR, Darmstadt

Fos-Cholin TM 16 (n-Hexadecylphosphocholin)	58066-85-6	Affymetrix, Wooburn Green, UK
Formaldehyd	50-00-0	AppliChem, Darmstadt
Glycerin	56-81-5	Carl Roth, Karlsruhe
Hämin	16009-13-5	Sigma-Aldrich, München
Hefeextrakt		Becton Dickinson, Heidelberg
Imidazol	288-32-4	AppliChem, Darmstadt
Isopropyl-β-D- thiogalactopyranosid (IPTG)	367-93-1	PEQLAB Biotechnologie, Erlan- gen
Kaliumdihydrogenphosphat	7778-77-0	Grüssing, Filsum
Magnesiumchlorid	7791-18-6	VWR, Darmstadt
Natriumacetat (wasserfrei)	127-09-3	Merck, Bruchsal
Natriumcarbonat (wasserfrei)	497-19-8	Merck, Bruchsal
Natriumchlorid	7647-14-5	VWR, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	10049-21-5	Merck, Bruchsal
Natriumdodecylsulfat (SDS)	151-21-3	Serva, Heidelberg
Natriumthiosulfat	10102-17-7	Sigma-Aldrich, München
Nickelsulfat	10101-97-0	AppliChem, Darmstadt
Pepton		Becton Dickinson, Heidelberg
Phosphorsäure	7664-38-2	Grüssing, Filsum
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	329-98-6	Merck, Bruchsal
Polysorbat 20 (Tween [®] 20)	9005-64-5	Sigma-Aldrich, München
Rotiphorese [®] Gel 30		Carl Roth, Karlsruhe
Saccharose	57-50-1	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure	7647-01-0	VWR, Darmstadt
Silbernitrat	7761-88-8	Honeywell Riedel-de-Haën, Seelze
Tris(hydroxymethyl)- aminomethan (Tris)	77-86-1	VWR, Darmstadt
Zitronensäure	5949-29-1	Grüssing, Filsum

3.1.5 Antibiotika-Stammlösungen

Antibiotikum	Konzentration	Lösungsmittel
Ampicillin	100 mg mL ⁻¹	Wasser (demineralisiert, steril)

3.1.6 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-His-HRP	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach

3.1.7 Kommerzielle Kits

Bezeichnung	Hersteller
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Bonn

3.1.8 Bakterienstämme

Bezeichnung	Hersteller	Genotyp
BL21-Gold (DE3)	Agilent Technologies, Waldbronn	E. coli B F- dcm+ Hte ompT hsdS(rB- mB-) gal l (DE3) endA Tetr

3.1.9 Kulturmedien

2YT

- 1,6 % (w/v) Pepton
- 1 % (w/v) Hefeextrakt
- 0,5 % (w/v) Natriumchlorid

Puffer für den Zellaufschluss

Aufschlusspuffer

- 30 mM Tris/HCl pH 7,5
- 200 mM Natriumchlorid
- 10 mM DTT
- 10 % (v/v) Glycerin
- 0,002 % (w/v) PMSF

3.1.10 Puffer und Lösungen für die native Reinigung

Nickelsulfatlösung

- 100 mM Nickelsulfat

Solubilisierungspuffer

- 30 mM Natriumphosphat pH 7,5

200 mM Natriumchlorid
0,002 % (w/v) PMSF
1 % (w/v) Fos-Cholin[®] 16

Waschpuffer pH 7,5

30 mM Tris/HCl pH 7,5
200 mM Natriumchlorid
0,002 % (w/v) PMSF
0,003 % (w/v) Fos-Cholin[®] 16

3.1.11 Puffer und Lösungen für die denaturierende Reinigung

Nickelsulfatlösung

100 mM Nickelsulfat

Solubilisierungspuffer

30 mM Natriumphosphat pH 7,5
200 mM Natriumchlorid
8 M Harnstoff

Waschpuffer

30 mM Tris/HCl pH 7,5
200 mM Natriumchlorid
8 M Harnstoff

3.1.12 Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE

Acrylamid/Bisacrylamid (AA/BAA) (Rotiphorese[®] Gel 30)

30 % Acrylamid
0,8 % Bisacrylamid

Entwickler

2,5 % (w/v) Natriumcarbonat (wasserfrei)
0,02 % (v/v) Formaldehyd

Färbelösung

0,1 % (w/v) Silbernitrat
0,02 % (v/v) Formaldehyd

Fixierer

30 % (v/v) Ethanol
10 % (v/v) Essigsäure

Inkubator

30 % (v/v) Ethanol
0,5 % (w/v) Natriumacetat (wasserfrei)
0,2 % (w/v) Natriumthiosulfat

Laufpuffer, 10x

0,25 M Tris
1,92 M Glycin
0,5 % SDS

Sammelgelpuffer, 5x, pH 6,7

0,25 M Tris/H₃PO₄
0,5 % SDS

Stopplösung

2,3 M Zitronensäure

Trenngelpuffer, 2,5x, pH 8,9

1,875 M Tris/H₃PO₄
0,25 % SDS

Probenpuffer, 4x

30 mM Borsäure
30 mM Tris
0,7 mM EDTA
5 mM Magnesiumchlorid
50 mM DTT
6,7 % (w/v) SDS
16,7 % (w/v) Saccharose
0,16 % (w/v) Bromphenolblau

3.1.13 Puffer und Lösungen für den Westernblot**Transferpuffer**

25 mM Tris
190 mM Glycin
10 % (v/v) Ethanol

TBS pH 7,5 - 8,0

10 mM Tris/HCl
150 mM Natriumchlorid

TBT pH 7,5 - 8,0

20 mM Tris
500 mM Natriumchlorid
0,05 % (v/v) Polysorbat 20

Caseinlösung pH 7,5 - 8,0

1 % (w/v) Casein in TBS
2 mL 2 M NaOH je 500 mL

3.1.14 Puffer und Lösungen für den Nachweis der Häminbindung

Häminlösung (1,1 mM)

1 mg Hämin
50 µL 1 M NaOH
ad 1,39 mL 50 mM Natriumphosphat pH 7,5

Häminlösung (11 mM)

10 mg Hämin
50 µL 1 M NaOH
ad 1,39 mL 50 mM Natriumphosphat pH 7,5

Puffer NP

500 mM Natriumchlorid
10 mM Natriumphosphat pH 7,5

Waschpuffer pH 6,5

30 mM BisTris/HCl pH 6,5
200 mM Natriumchlorid
0,002 % (w/v) PMSF
0,003 % (w/v) Fos-Cholin[®] 16

Waschpuffer pH 8,5

30 mM Tris/HCl pH 8,5
200 mM Natriumchlorid
0,002 % (w/v) PMSF
0,003 % (w/v) Fos-Cholin[®] 16

CD-Puffer

50 mM Kaliumphosphat pH 7,4
0,003 % (w/v) Fos-Cholin[®] 16

3.2 Methoden

Die Expression und Reinigung von RTE1 wurde bereits am Institut im Rahmen einer Diplomarbeit (Malach, 2009) etabliert. Im Verlauf dieser Arbeit wurden aber am Reinigungsprotokoll (vgl. 3.2.4) Optimierungen vorgenommen.

3.2.1 Transformation in *E. coli*

Zur Transformation von *Escherichia coli* (*E. coli*) wurde ein auf dem Vektor pET-15b der Firma Novagen basierendes Konstrukt eingesetzt. Hierbei wurde die RTE1-kodierende Sequenz über die *NdeI*-Schnittstelle hineinkloniert. N-terminal sitzt ein Hexa-His-Tag zur späteren affinitätschromatographischen Reinigung des Proteins. Das RTE1-kodierende Gen befindet sich zwischen einem T7-Promotor bzw. -Terminator, so dass zur Transkription eine T7-RNA-Polymerase benötigt wird. Sowohl die Transkription der T7-RNA-Polymerase, als auch der T7-Promotor werden durch den Lac-Repressor (*lacI*) reprimiert. Durch Zugabe des Lactose-Analogons IPTG löst sich der Repressor von den regulatorischen Sequenzen und ermöglicht zunächst die Transkription der T7-RNA-Polymerase, welche ihrerseits dann die für RTE1-kodierende Sequenz transkribiert.

Als Selektionsmarker vermittelt pET-15b eine Ampicillinresistenz. Das Konstrukt aus pET-15b und der RTE1-kodierenden Sequenz wird im Folgenden als pET-15b-RTE1 bezeichnet.

Die Transformation erfolgte mittels einer Hitzeschocktransformation: 50 μL chemisch kompetente Zellen wrden auf Eis aufgetaut und mit 1 μL Plasmid-Lösung versetzt. Anschließend werden die Zellen für 10 min auf Eis inkubiert. Es erfolgt ein Hitzeschock bei 42 °C für 90 s. Die Zellen für 2 min auf Eis und nach Zugabe von 400 μL 2YT-Medium für 1 h unter leichtem Schütteln bei 37 °C im Thermoblock inkubiert.

Der Ansatz wurde dann auf 2YT-Agarplatten mit 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

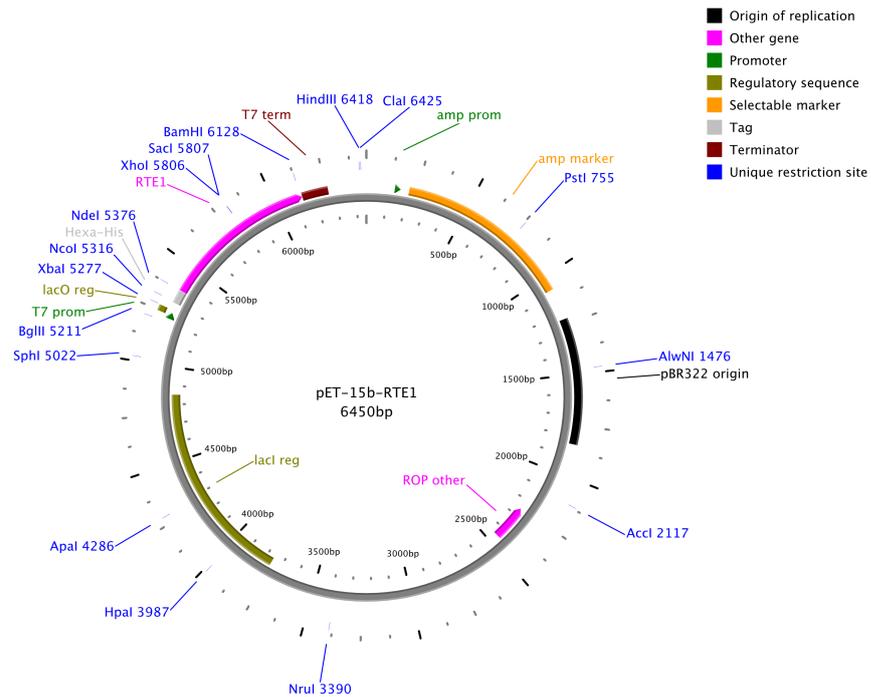


Abbildung 3.1: Vektorkarte von pET-15b-RTE1. RTE1 ist rosa markiert und befindet sich zwischen Position 5377 und 6142. Die Vektorkarte wurde mit PlasMapper (Dong u. a., 2004) erstellt.

3.2.2 Expression in E. coli

Kompetente Zellen wurden wie in 3.2.1 beschrieben transformiert. Von den Platten wurden dann Vorkulturen mit einem Volumen von 100 mL 2YT-Medium in 250 mL-Kolben ohne Schikane angeimpft, mit 100 μ L Ampicillin-Lösung versetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die Hauptkulturen mit einem Volumen von 500 mL 2YT-Medium in schikanierten 1 L-Kolben wurden mit 500 μ L Ampicillin-Lösung versetzt und mit 5 mL der Vorkultur inokuliert. Die Induktion erfolgte bei einer OD_{600} von 0,6 bis 0,8 mit 0,3 mM IPTG.

Die Inkubation im Schüttler erfolgte bis zur Induktion bei einer Temperatur von 35 °C und nach der Induktion bei 30 °C. 4 h nach der Induktion wurden die Zellen bei 7000 x g für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert.

3.2.3 Zellaufschluss

4 g eingefrorene Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in 20 mL Aufschlusspuffer resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte durch dreifache Hochdruckdispersion in einer auf 4 °C gekühlten French-Press[®] bei einem Druck von 1200 psi bis 1500 psi.

3.2.4 Native Reinigung

Mit einem Poly-Histidin-Tag markierte Proteine lassen sich über eine Metallchelat-Affinitätschromatographie aus einem Proteingemisch isolieren. Bei dem im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Säulenmaterial handelt es sich um Iminodiessigsäure (IDA), welche an Agarose immobilisiert ist. Ni^{2+} -Ionen werden von IDA dreifach koordinativ komplexiert, so dass drei Koordinationsstellen für die Interaktion der Poly-Histidin-markierten Proteine mit den immobilisierten Ni^{2+} -Ionen zur Verfügung stehen. Die Elution der spezifisch an das Säulenmaterial gebundenen Proteine erfolgt über Zugabe von Imidazol, welches als Struktur analogon zu Histidin in der Lage ist, dieses aus der Bindung mit Ni^{2+} zu verdrängen.

Die aufgeschlossenen Zellen (vgl. 3.2.3) wurden bei 230 000 x g für 20 min in einer auf 4 °C gekühlten Ultrazentrifuge abzentrifugiert und das Pellet in 10 mL Solubilisierungspuffer resuspendiert. Der Ansatz wurde mit 1 % (w/v) Fos-CholinTM 16 ver-

setzt. Das ursprüngliche Reinigungsprotokoll (vgl. Malach, 2009) sah eine Solubilisierung über einen Zeitraum von 10 min bei Raumtemperatur im Ultraschallbad vor. Hierfür musste das Lysat auf mehrere 1,5 mL-Reaktionsgefäße aufgeteilt werden. Um die Anzahl der Arbeitsschritte zu verringern und die Kühlkette nicht bei der Solubilisierung abbrechen zu lassen, erfolgte die Solubilisierung im Rahmen dieser Arbeit über einen Zeitraum von 30 min im Eisbad mittels eines Ultraschalldesintegrators.

Das Solubilisat wurde einer erneuten Ultrazentrifugation bei 230 000 x g und 4 °C für 20 min unterzogen. Der Überstand wurde in die nachfolgenden Reinigungsschritte eingesetzt. Zwei Tropfsäulchen wurden mit jeweils 0,6 mL Ni-IDA befüllt. Es wurden nacheinander je 5 CV Nickelsulfatlösung und 5 CV Milli-Q-Wasser auf die Säulen gegeben. Anschließend wurde der Überstand aus der Ultrazentrifugation auf beide Säulen verteilt. Es folgten zwei Waschschrte mit je 20 CV Waschpuffer bzw. Waschpuffer + 75 mM Imidazol. Die Elution erfolgte mit 8 CV Waschpuffer + 250 mM Imidazol. Für die spätere Analyse wurden von allen Schritten der Reinigung Proben genommen und später auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

Auch für die eigentliche Reinigung wurde das ursprüngliche Protokoll vereinfacht. Es sah unter anderem die Verwendung von sechs Tropfsäulchen mit jeweils 0,2 mL Säulenmaterial, sowie zwei weitere Waschschrte mit 20 mM bzw. 50 mM Imidazol (Malach, 2009) vor.

Das Säulenmaterial wurde gemäß den Herstellerangaben vor der Wiederverwendung regeneriert und in 20 % (v/v) Ethanol bei 4 °C gelagert.

3.2.5 Denaturierende Reinigung

Die denaturierende Reinigung wurde analog zur nativen Reinigung (vgl. 3.2.4) durchgeführt, mit dem Unterschied, dass der Solubilisierungspuffer statt Fos-Cholin[®] 16 8 M Harnstoff enthielt. Durch die Zugabe von Harnstoff werden die im Zelllysate enthaltenen Proteine denaturiert, was dazu führt, dass membranintegrale bzw. -gebundene Proteine aus den Membranen gelöst werden. Durch die Denaturierung steht darüber hinaus der His-Tag vollständig für die Bindung an das Säulenmaterial zur Verfügung. Das Pellet wurde in diesem Puffer über einen Zeitraum von einer halben Stunde mittels eines Magnetrührers resuspendiert. Es erfolgte eine erneute

Ultrazentrifugation, nach welcher der Überstand auf die mit Ni-IDA befüllten Säulen verteilt wurde. Wasch- und Elutionspuffer enthielten ebenfalls 8 M Harnstoff.

3.2.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Proteinproben wurden auf Polyacrylamid-Gele aufgetragen und dort nach ihrer Masse aufgetrennt (Laemmli, 1970). Durch die Zugabe von Natriumdodecylsulfat SDS werden die Proteine denaturiert und mit einer negativen Ladung maskiert, wodurch sie ein einheitliches Ladungs-Masse-Verhältnis aufweisen. Die Wanderungsgeschwindigkeit im dann angelegten elektrischen Feld durch das Gel ist somit allein von der Proteinmasse abhängig. Vor dem Auftrag auf das Gel wurden die Proben mit 4x-Probenpuffer versetzt. Expressionsproben wurden vor dem Auftragen für 10 min auf 95 °C erhitzt. Das Auftragsvolumen berechnete sich dann wie folgt:

$$V[\mu\text{L}] = \frac{15}{\text{OD}_{600}} \cdot 0,75 \quad (3.1)$$

Für die Elektrophorese wurden 15 %ige Gele eingesetzt. Tabelle 3.2 enthält ein Pipettierschema für drei kleine Gele der Größe 9 cm x 10 cm.

Tabelle 3.2: Pipettierschema für SDS-Gele

	Trenngel	Sammelgel
AA/BAA 30	16,5 mL	2 mL
Trenn-/Sammelgelpuffer	12,9 mL	2,6 mL
Milli-Q-Wasser	3,6 mL	7,4 mL
TEMED	16,5 μL	12,3 μL
APS 10 % (w/v)	112 μL	129 μL

Zur späteren Größenzuordnung wurden die in 3.1.3 genannten Größenstandards eingesetzt. Nach dem Beladen wurde für etwa 45 min 35 mA je Gel angelegt.

3.2.7 Silberfärbung

Mit Hilfe der Silberfärbung lassen sich Proteine in Polyacrylamidgelen bis zu einer Nachweisgrenze von etwa 5 ng pro Bande detektieren. Ag^+ -Ionen bilden Komplexe mit den Seitenketten der Aminosäuren Glutamat, Aspartat und Cystein aus und können durch formaldehydhaltige Natriumcarbonatlösung zu elementarem Silber reduziert werden. Hierdurch treten die Banden im Gel dunkelbraun bis schwarz hervor. Der Ablauf der Färbung ist Tabelle 3.3 zu entnehmen.

Tabelle 3.3: Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Lösung	Dauer	Wiederholungen
Fixierer	10 min	1
Inkubator	10 min	1
dH ₂ O	10 min	3
Färbelösung	10 min	1
dH ₂ O	kurzes Waschen	1

Anschließend wurde das Gel mit Entwicklerlösung überschichtet und bis zur genügenden Ausprägung der Färbung geschwenkt. Die Färbung wurde durch Zugabe von 2,3 M Zitronensäure ($\frac{1}{10}$ des Volumens an Entwicklerlösung) gestoppt.

3.2.8 Westernblot und immunologischer Nachweis von Proteinen

Über einen Westernblot können Proteine aus einem SDS-Gel elektrophoretisch auf einen Membran übertragen und dort fixiert werden. Über eine Immunfärbung kann anschließend eine Visualisierung der Proteinen auf der Membran erfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit kam das Semi-Dry-Blotverfahren, sowie eine Nitrozellulosemembran mit einer Porengröße von 0,2 μm zum Einsatz.

Bei Gelen, welche für einen Westernblot vorgesehen waren, kam ein gefärbter Proteingrößenstandard zum Einsatz. Das Gel wurde für etwa 10 min in Transferpuffer

inkubiert. Die benötigten Filterpapiere, sowie die Nitrozellulosemembran wurden ebenfalls kurz in Transferpuffer getränkt.

Auf die Anode der Blotapparatur wurden zunächst drei Lagen Filterpapier, gefolgt von der Blotmembran, dem Gel sowie drei weiteren Lagen Filterpapier gegeben. Anschließend wurde die Apparatur geschlossen und für 2 h eine Stromstärke von 1 mA cm^{-2} angelegt.

Nach Abschluss des Blotvorgangs wurde die Membran entnommen und 1 h in einer 1 %igen Caseinlösung in TBS auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Es schlossen sich zwei Waschschriffe mit TBT und einer mit TBS zu jeweils 10 min an.

Die Membran wurde dann zusammen mit einer 1 %igen Caseinlösung in TBS, welche den Anti-His-HRP-Antikörper im Verhältnis 1:10000 enthielt, in Folie eingeschweißt und über Nacht bei $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ auf einem Taumelschüttler inkubiert. Am nächsten Tag erfolgten wiederum zwei Waschschriffe mit TBT und einer mit TBS zu jeweils 10 min. Der gebundene Antikörper ließ sich über die gekoppelte *horseradish peroxidase*, Meerrettich-Peroxidase (HRP) mit Hilfe eines Chemilumineszenzreagenzes nachweisen. Die HRP oxidiert in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid das Substrat Luminol, wobei es zu einer Lichtemission kommt.

Hierfür wurde die Membran in Folie eingeschlagen und mit dem Reagenz überschichtet. Für die Visualisierung wurde ein Lumineszenzdetektor (LAS 4000 mini, Fuji) eingesetzt.

3.2.9 Proteinbestimmung über einen Bicinchoninsäure-Assay

Die Proteinkonzentration in einer Lösung kann über einen Bicinchoninsäure-Assay ermittelt werden (Smith u. a., 1985). Cystein, Cystin, Tyrosin, Tryptophan und die Peptidbindung selbst sind in der Lage Cu^{2+} zu Cu^{+} zu reduzieren, mit welchen Bicinchoninsäure (BCA) spezifisch einen farbigen Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm bildet (Wiechelman, 1988). Die Absorption kann dann photometrisch gemessen und für die Berechnung der Proteinkonzentration verwendet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Proteinbestimmungen mit dem „BCA Protein Assay Kit“ durchgeführt. Das BCA-Reagenz wurde gemäß den Herstellerangaben angesetzt. Anschließend wurden die in den Tabellen 3.4 und 3.5 aufgeführten An-

sätze in Halbmikroküvetten pipettiert und gevortext.

Es folgte eine Inkubation bei 37 °C für 30 min im Brutschrank, woran die Absorptionsmessung anschloss. Bei der Berechnung der Proteinkonzentration in den Proben ist zu berücksichtigen, dass die Proben für die Kalibriergeraden im Vergleich zu den Proben um den Faktor 10 verdünnt wurden. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Tabelle 3.4: Pipettierschema für BCA-Kalibriergerade

Proteinmenge [µg]	0	2	4	6	8	10
BSA-Standard [µL]	0	1	2	3	4	5
Puffer [µL]	10	10	10	10	10	10
BCA-Reagenz [µL]	990	989	988	987	986	985

Tabelle 3.5: Pipettierschema für BCA-Proben

Probe [µL]	10
BCA-Reagenz [µL]	990

3.2.10 Nachweis der Häminbindung

Bei Häminen handelt es sich um Komplexverbindungen der Häme, wobei das Eisenion in der Oxidationsstufe +III vorliegt. Als axialen Liganden weisen sie ein Chloridion auf. Das Hämin b des Häm b wird als Hämin bezeichnet (Fischer, 1999).

Für den Nachweis einer Häminbindung durch RTE1 kamen vier unterschiedliche Methoden zum Einsatz: Eine Affinitätschromatographie mit Hämin-Agarose, ein Photometrischer Nachweis über die Zugabe von freiem Hämin, der Nachweis über einen Tyrosin-Quench bei Zugabe von freiem Hämin sowie der Nachweis einer Sekundärstrukturänderung bei Häminzugabe über eine CD-Spektroskopie. Für jede Methode kam jeweils frisch präpariertes RTE1 zum Einsatz.

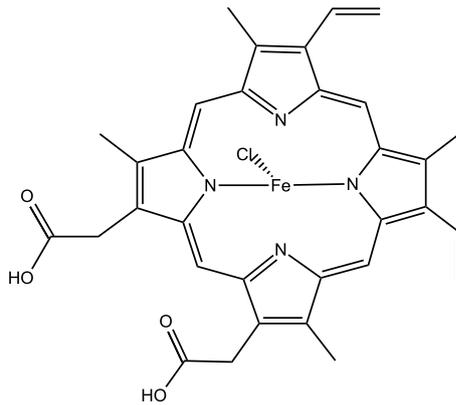


Abbildung 3.2: Struktur des Hämins (eigene Darstellung)

Affinitätschromatographie mit Häm-in-Agarose

Beim affinitätschromatographischen Nachweis wurde ein Säulenmaterial eingesetzt, bei welchem Häm-in kovalent an Agarose als Trägermatrix gebunden ist. Häm-in-bindende Proteine können dann an das immobilisierte Häm-in binden. Die Elution kann entweder über die Zugabe von freiem Häm-in, welches mit dem immobilisierten Häm-in um die Bindung mit den Proteinen konkurriert, oder denaturierend über die Zugabe von SDS und gleichzeitigem Erhitzen des Säulenmaterials erfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit kam ein Batch-Verfahren zum Einsatz, welches den Nachweis einer Bindung mit vergleichsweise wenig Säulenmaterial ermöglicht (Tsutsui u. Mueller, 1982).

50 μL Häm-in-Agarose-Suspension wurden in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben und drei Mal mit jeweils 150 μL NP-Puffer mit 0,003 % Fos-Cholin[®] 16 im Thermoschüttler bei 20 °C unter Schütteln äquibriert. Zum Sedimentieren der Agarose-Beads wurden die Reaktionsgefäße 10 s bei 2000 x g zentrifugiert.

Nach dem Äquilibrieren wurden 50 μL Proteinlösung auf die Beads gegeben und für 30 min bei 20 °C im Thermoschüttler unter Schütteln inkubiert. Es schlossen sich drei Waschschrirte mit jeweils 500 μL NP-Puffer versetzt mit 0,003 % Fos-Cholin[®] 16 an. Hierbei wurden die Reaktionsgefäße wiederum unter Schütteln für 10 min bei 20 °C inkubiert. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 50 μL 2x SDS-Probenpuffer und Erhitzen auf 99 °C für 5 min oder durch Zugabe einer 11 mM Häm-in-Lösung.

Photometrie

Häm-bindende Proteine zeigen, wenn ein Häm gebunden ist, häufig ein charakteristisches Absorptionsmaximum im so genannten Soret-Band um 400 nm. Außerdem ist hierbei in vielen Fällen eine Blauverschiebung des Soret-Peaks zu beobachten, da das Protein bzw. der Protein-Häm-Komplex unterschiedliche Absorptionsmaxima aufweisen (Duncan u. a., 1999). Die Bindung von Hämin an ein Protein kann also durch Beobachtung der Absorptionsmaxima im Soret-Band bzw. ihrer relativen Verschiebung zueinander bestimmt werden.

Hierfür wurde RTE1 nach der Reinigung über eine PD10-Säule in Waschpuffer pH 7,5 ohne Imidazol umgepuffert. Die Proteinlösung wurde dann mit Waschpuffer soweit verdünnt, dass in einem Endvolumen von 500 μL eine Proteinkonzentration von 1,5 μM vorlag und in eine Quarzglasküvette überführt. Anschließend wurde ein Absorptionsspektrum im Bereich von 300 nm bis 500 nm aufgenommen. Hämin wurde hinzutitriert, so dass die in Tabelle 3.6 aufgeführten Endkonzentrationen erreicht wurden. Alle Messungen erfolgten bei 25 °C, je Messreihe wurden sechs Spektren aufgenommen. Zusätzlich wurden Pufferspektren aufgenommen, sowohl ohne als auch mit Hämin-Zugabe. Zur Ermittlung der tatsächlich in der Küvette vorliegenden Häminkonzentration wurde die Küvette mit 500 μL 1 M NaOH befüllt, Häminstamm-lösung hinzutitriert und Absorptionsspektren aufgenommen. Aus diesen konnte mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von Hämin (Datenblatt des Herstellers) die Konzentration in der Küvette bestimmt werden.

Tabelle 3.6: Hämin-Konzentration für die UV-Vis-Spektroskopie

Hämin-Konzentration [μM]	Volumen [μL]
0	0
2	0,9
5	0,9
10	0,9
15	2,3
20	2,3
30	4,6
40	4,6

Fluoreszenzspektroskopie

Bei der Anregung eines Fluorophors mit Licht einer bestimmten Wellenlänge, kommt es zu einer Stokes-verschobenen Lichtemission bei einer für das Fluorophor spezifischen Wellenlänge. Bei Zugabe eines Quenchers tritt eine Fluoreszenzauslöschung (Quench) auf. Hierfür können unterschiedliche Effekte verantwortlich sein, allen gemein ist aber, dass sie entweder den Übergang des Fluorophors von seinem Grund- in den angeregten Zustand verhindern, oder den angeregten Zustand strahlungslos zurück in den Grundzustand überführen. Beispielsweise kann dies über eine Stoßdeaktivierung – eine Kollision zwischen Fluorophor und Quencher – oder einen Resonanzenergietransfer vom Fluorophor auf den Quencher erfolgen (Atkins u. de Paula, 2006). In der Proteinanalytik wird häufig Tryptophan angeregt, dessen Absorptionsmaximum bei 280 nm liegt und ein Emissionsmaximum im Bereich zwischen 300 nm bis 350 nm aufweist (Lottspeich, 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Tryptophane in RTE1 bei 280 nm angeregt und das Emissionsspektrum zwischen 300 nm bis 400 nm aufgenommen. Hierfür wurde zunächst RTE1 nach der Reinigung in Waschpuffer pH 7,5 ohne Imidazol über eine PD10-Säule umgepuffert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 500 μL mit einer Proteinkonzentration von 2,5 μM in die Messung eingesetzt. Im Verlauf der Messung wurde Häm in bis zu einer Endkonzentration von 60 μM hinzutitriert. Es wurden drei Messreihen durchgeführt, wobei jedes aufgenommene Spektrum zehnfach akkumuliert wurde. Zusätzlich wurde ein Pufferspektrum mit entsprechender Häminkonzentration aufgenommen. Die Auswertung erfolgte über die Differenzspektren.

Wie beim photometrischen Bindungsnachweis erfolgte die Bestimmung der tatsächlich vorliegenden Häminkonzentration über die Aufnahme von Absorptionsspektren und den vom Hersteller angegebenen Extinktionskoeffizienten.

Tabelle 3.7: Hämin-Konzentration für die Fluoreszenzspektroskopie

Hämin-Konzentration [μM]	Volumen Stammlösung [μL]	Konzentration Stammlösung [mM]
0	0	
0,5	0,9	
1	0,9	
1,5	0,9	
2	0,9	0,275 mM
2,5	0,9	
3	0,9	
4	1,8	
6	0,92	
8	0,92	
10	0,92	
20	4,6	1,1 mM
40	9,4	
60	9,5	

CD-Spektroskopie

Bei der CD-Spektroskopie wird die Wechselwirkung von optisch aktiven Substanzen mit zirkular polarisiertem Licht zu analytischen Zwecken ausgenutzt. Eine links- und eine rechtszirkulare Lichtwelle überlagern sich hierbei zu linear polarisiertem Licht. Optisch aktive Substanzen weisen für die links- bzw. rechtszirkulare Komponente unterschiedliche Absorptionskoeffizienten ϵ_L und ϵ_R , wobei letztlich ihre Differenz $\Delta\epsilon$ gemessen und als Elliptizität θ angegeben. d sei die Schichtdicke und c die Konzentration (Lottspeich, 2006):

$$\theta(\lambda) = \Delta\epsilon \cdot c \cdot d \quad (3.2)$$

Die CD-Spektroskopie kann für die Analyse von Proteinsekundärstrukturen eingesetzt werden. Hierbei werden Spektren im Bereich von 160 nm bis 250 nm aufgenommen. Man macht sich dabei zu Nutze, dass in diesem Bereich die $n \rightarrow \pi^*$ bzw. $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge der Peptidbindung liegen. Durch ihre Chiralität reagiert das CD-Spektrum eines Peptids sehr empfindlich auf Änderungen der Sekundärstruktur (Lottspeich, 2006). Die Messungen erfolgten in CD-Puffer bei einer Proteinkonzentration von $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$. Von den Rohdaten wurde das Pufferspektrum abgezogen und unter Berücksichtigung von Konzentration und Molekulargewicht in molaren CD ($\Delta\epsilon$) umgerechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Native Reinigung von RTE1

Die native Reinigung nach dem angepassten Protokoll (vgl. 3.2.4) zeigte vergleichbare Ergebnisse zum ursprünglichen Reinigungsprotokoll (Malach, 2009), so dass auf Grund der einfacheren Verfahrensweise dieses auch im weiteren Verlauf der Arbeit angewandt wurde.

Sowohl Westernblot (Abbildung 4.2), als auch SDS-PAGE (Abbildung 4.1) zeigen einen großen Anteil nicht solubilisierten Proteins im Größenbereich um 28 kDa. Darüberhinaus zeigen sich Multimere unterschiedlicher Molekularität. In der Regel ließen sich aus 4 g Zellen etwa 0,75 mg Protein reinigen.

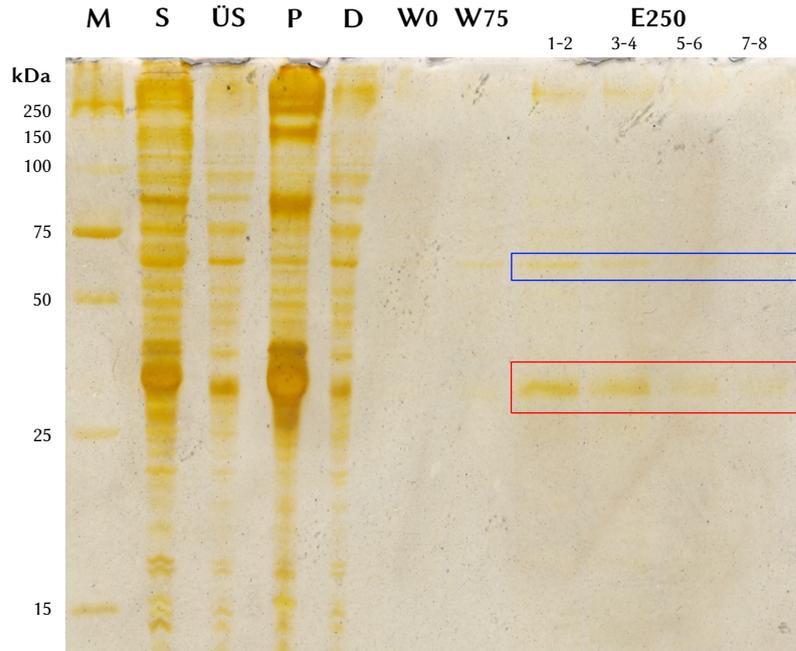


Abbildung 4.1: SDS-PAGE der native Reinigung von RTE1; In der Reihenfolge des Auftragens: Marker (M), Solubilisat (S), Überstand aus Ultrazentrifugation (ÜS), Pellet aus Ultrazentrifugation (P), Durchlauf (D), Waschschrirte (W0, W75), Elution (E250); Zahlen unterhalb von E250 geben die Säulenvolumen an. Rot umrandet wurden die Banden des RTE1-Monomers (28 kDa), blau umrandet die eines mutmaßlichen RTE1-Dimers (56 kDa). Deutlich sind bei P große Mengen nicht solubilisierten Proteins (28 kDa) zu erkennen.

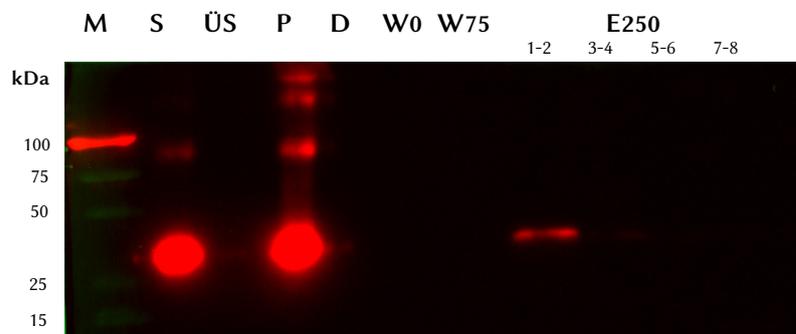


Abbildung 4.2: Westernblot der native Reinigung von RTE1; In der Reihenfolge des Auftragens: Marker (M), Solubilisat (S), Überstand aus Ultrazentrifugation (ÜS), Pellet aus Ultrazentrifugation (P), Durchlauf (D), Waschschrirte (W0, W75), Elution (E250); Zahlen unterhalb von E250 geben die Säulenvolumen an. Chemilumineszenzsignale sind rot hervorgehoben, Markerbanden grün. Gut zu erkennen sind die Signale in der ersten Elutionsfraktion, sowie dem Solubilisat und Pellet nach Ultrazentrifugation. In letzterem zeigt sich, dass große Mengen RTE1 nicht solubilisiert wurden. In S und P zeigen sich RTE1-Multimere bzw. Aggregate.

4.2 Denaturierende Reinigung

In der Regel konnte unter nativen Bedingungen RTE1 in ausreichender Menge für die nachfolgenden Versuche präpariert werden. In einigen Fällen schlug die Solubilisierung von RTE1 allerdings fehl, so dass die Möglichkeit einer denaturierenden Reinigung in Hinblick auf zukünftige Experimente untersucht wurde.

Unter denaturierenden Bedingungen konnten weitaus größere Mengen RTE1 gereinigt werden, als mit der nativen Reinigung (vgl. 4.1). Das SDS-Gel zeigt entsprechend kräftigere Banden in den Elutionsfraktionen (Abbildung 4.3).

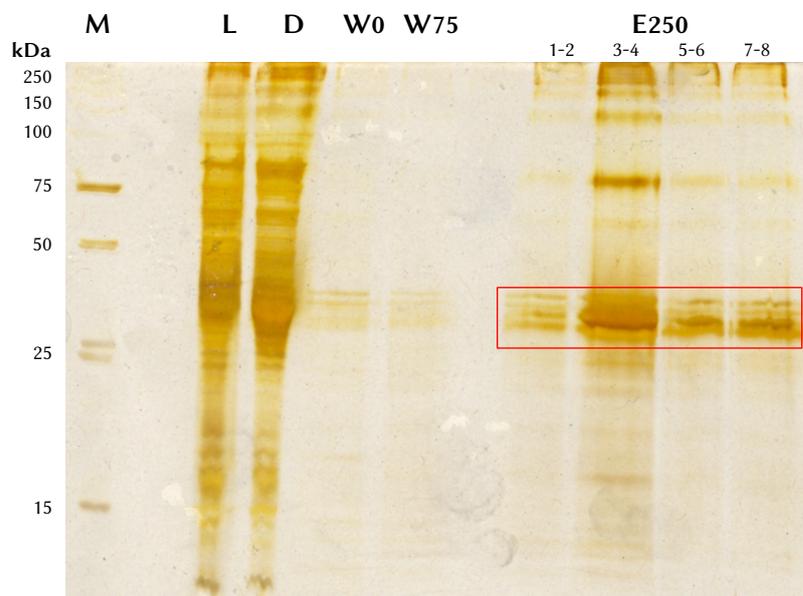


Abbildung 4.3: SDS-PAGE der denaturierenden Reinigung von RTE1; In der Reihenfolge des Auftragens: Marker (M), Zellessat (L), Durchlauf (D), Waschschritte (W0, W75), Elution (E250); Rot umrandet sind die RTE1-Bande.

4.3 Häminagarose-Assay

Die SDS-PAGE der Proben aus dem Häminagarose-Assay zeigt in der Elutionsfraktion eine Bande bei 28 kDa. Eine entsprechende Bande zeigt sich im aufgetragenen

Proteinkonzentrat. Im Durchlauf ist nur ein sehr schwaches Signal zu erkennen, die Waschfraktionen weisen keine sichtbaren Banden auf (Abbildung 4.5).

Um die Spezifität der Bindung nachzuweisen wurde in weiteren Versuchen zur Elution eine Lösung von freiem Hämin (11,1 mM) eingesetzt. Auch hier zeigte sich eine – allerdings schwächere – Bande in der Elutionsfraktion. Danach noch gebundenes Protein wurde wie zuvor mit SDS-Probenpuffer und Erhitzen eluiert.

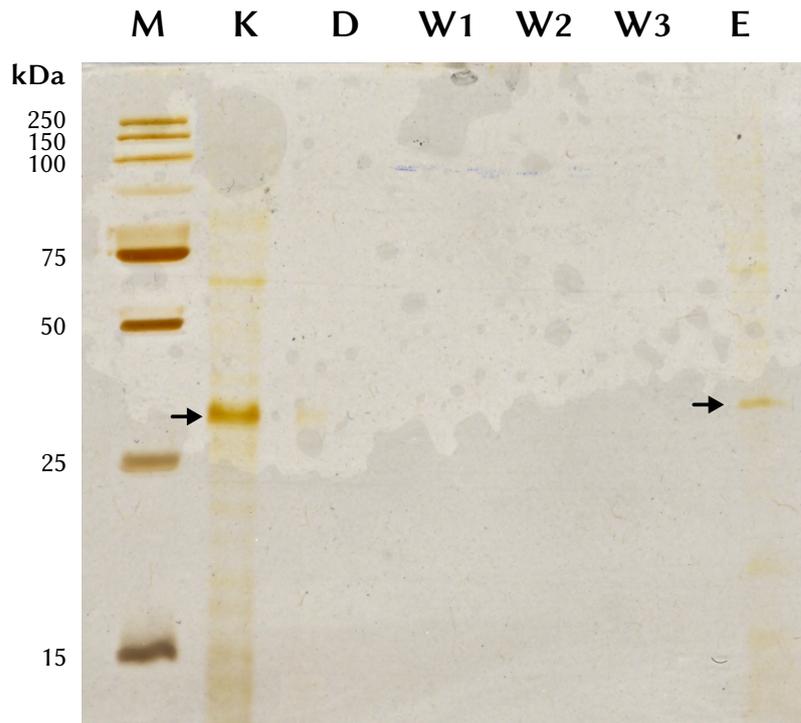


Abbildung 4.4: SDS-PAGE eines Häminagarose-Assays; Von links nach rechts: Marker (M), Proteinkonzentrat (K), Durchlauf (D), Waschschrirte (W1-3), Elution (E); Eluiert wurde mit 2x SDS-Probenpuffer und Erhitzen auf 99 °C. Die RTE1-Banden in Konzentrat und Elution sind durch Pfeile markiert. Beim Auftragen wurden die Verdünnungsfaktoren berücksichtigt.

4.4 Photometrischer Bindungsassay

Zur Analyse der Bindungseigenschaften von RTE1 an Hämin wurden drei Messreihen bei unterschiedlichen pH-Werten – pH 6,5; pH 7,5; pH 8,5 – durchgeführt.

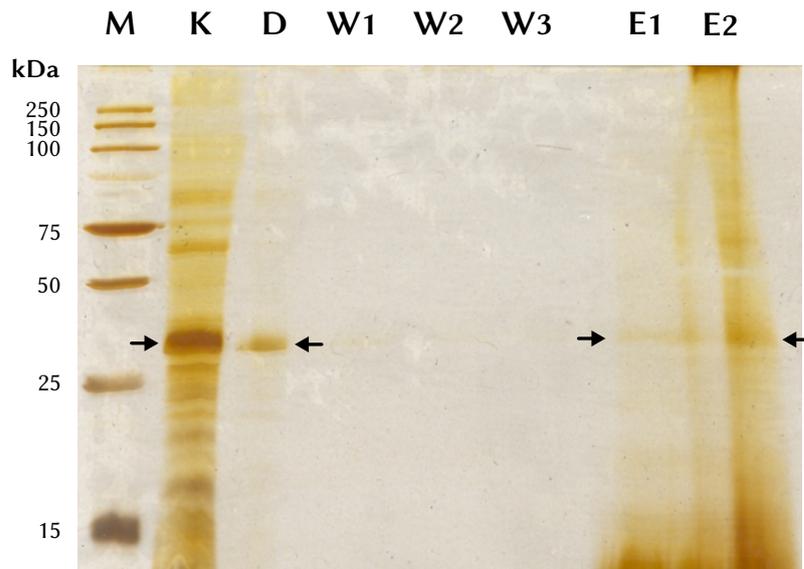


Abbildung 4.5: Spezifität der Hämin-Bindung; Von links nach rechts: Marker (M), Protein-konzentrat (K), Durchlauf (D), Waschschrte (W1-3), Elutionen (E1, E2); E1 wurde mit 11 mM freiem Hämin, E2 im Anschluss an E1 mit 2x SDS-Probenpuffer und Erhitzen auf 99 °C eluiert. Die RTE1-Banden sind durch Pfeile markiert. Die durchgängige Hintergrundfärbung von E1 und E2 und insbesondere die starke Färbung im Bereich unterhalb von 15 kDa wird durch das freie Hämin hervorgerufen. Beim Auftragen wurden die Verdünnungsfaktoren berücksichtigt.

Hierfür wurden Aliquots der gereinigten Proteinlösung mit einem Volumen von jeweils 2,5 mL wie in 3.2.10 beschrieben in die Waschpuffer pH 6,5, pH 7,5 und pH 8,5 umgepuffert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Proteinlösungen dann auf eine Konzentration von $1,5\ \mu\text{M}$ verdünnt und in die Messung eingesetzt. Die Obergrenze der eingesetzten Häminkonzentration von $40\ \mu\text{M}$ ergab sich durch die Spezifikationen des verwendeten Photometers. Eine $50\ \mu\text{M}$ Häminkonzentration weist bereits eine maximale Absorption von über 3 auf, der Obergrenze laut Herstellerangaben.

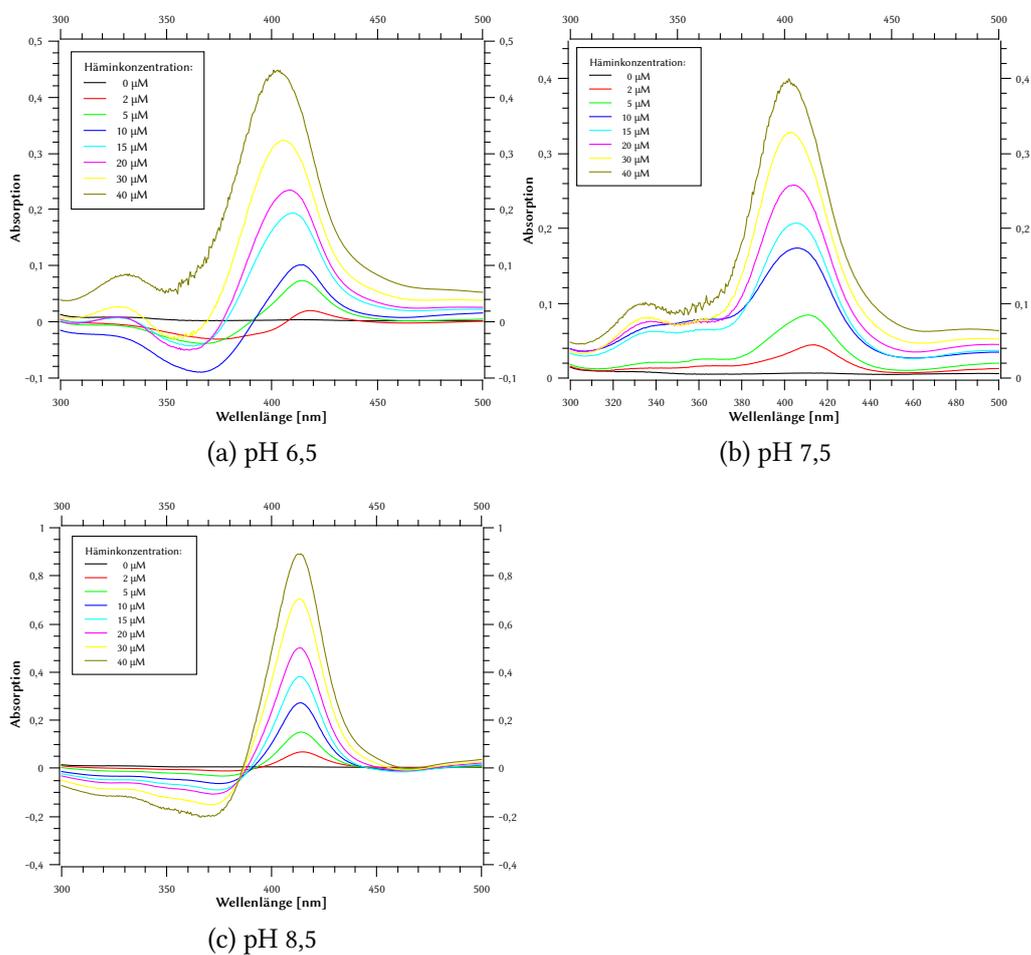
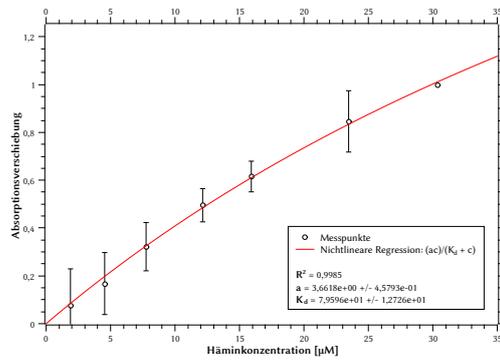


Abbildung 4.6: Differenzspektren des photometrischen Bindungsassays; Insbesondere bei pH 6,5 (a) und pH 7,5 (b) ist deutlich eine Verschiebung der Absorptionsmaxima bei höheren Häminkonzentrationen hin zu kürzeren Wellenlängen sichtbar.

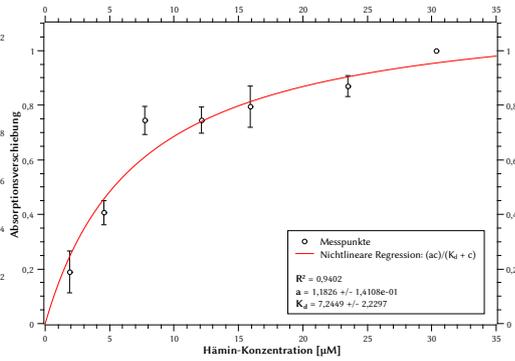
Zur Bestimmung des K_d -Werts der Bindung wurde die Verschiebung der Absorptionsmaxima ΔA zueinander gegen die größte gemessene Verschiebung normiert und gegen die tatsächlich vorliegende Häminkonzentration c aufgetragen. Letztere wurde über den Absorptionskoeffizienten von Häm in aus den aufgenommenen Pufferspektren bestimmt. Anschließend wurde eine Sättigungsfunktion über eine nichtlineare Regression angepasst:

$$\Delta A = \frac{a \cdot c}{K_d + c} \quad (4.1)$$

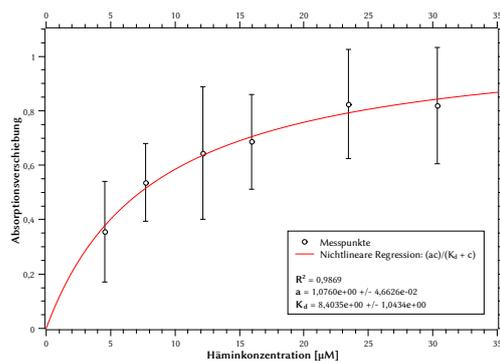
a sei hierbei die Kapazität. Die entsprechenden Auftragungen und Sättigungsfunktionen sind in Abbildung 4.7 dargestellt.



(a) pH 6,5



(b) pH 7,5



(c) pH 8,5

Abbildung 4.7: Relative Verschiebung der Absorptionsmaxima; Bei pH 7,5 und 8,5 ist eine beginnende Sättigung zu erkennen, die Kapazität liegt hierbei jeweils um 1, die K_d -Werte sind unter Berücksichtigung der Standardabweichung annähernd identisch. Bei pH 8,5 fallen die großen Standardabweichungen der Messwerte, sowie die zu hohe Kapazität auf. Letztere sollte durch die Normierung eigentlich 1 betragen. Darüberhinaus ist keine deutliche Sättigung sichtbar.

4.5 Fluoreszenzspektroskopie

Nachdem sich im photometrischen Bindungsassay der kleinste K_d -Wert bei einem pH von 7,5 zeigte, wurde diese Bedingung auch für die Fluoreszenzspektroskopie gewählt. Nach Anregung bei einer Wellenlänge von 280 nm und Abzug des Pufferspektrums ergaben sich die in Abbildung 4.8 dargestellten Emissionsspektren. Es zeigte sich ein deutlicher Quench bei zunehmender Häminkonzentration, der seine volle Ausprägung bei einer Häminkonzentration von 20 μM bis 40 μM erreichte.

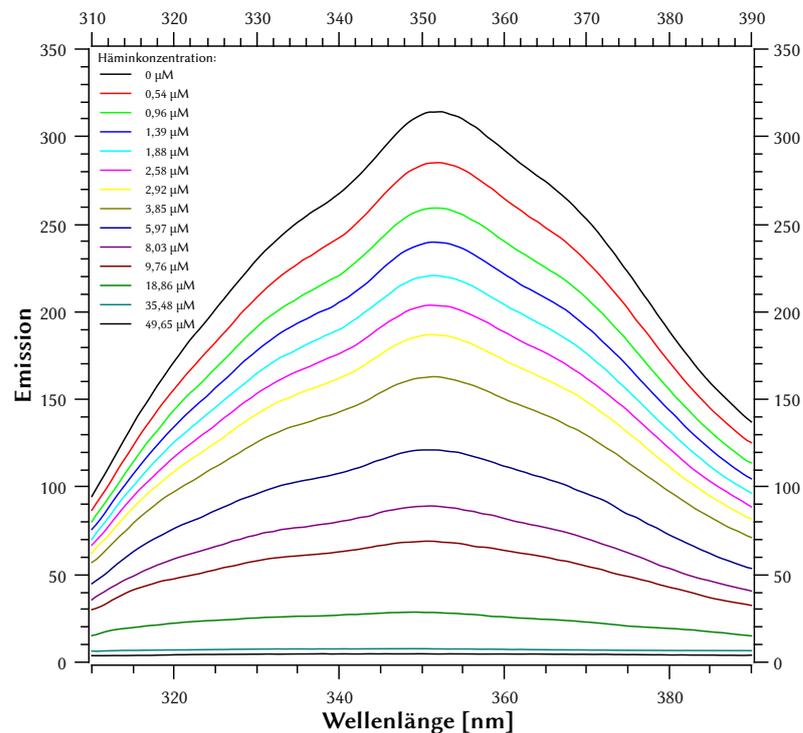


Abbildung 4.8: Emissionsspektrum des Fluoreszenz-Assays nach Abzug des Pufferspektrums; Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Es ist ein deutlicher Quench bei zunehmender Häminkonzentration zu erkennen. Der Quench ist bei etwa 20 μM bis 40 μM Häminkonzentration vollständig.

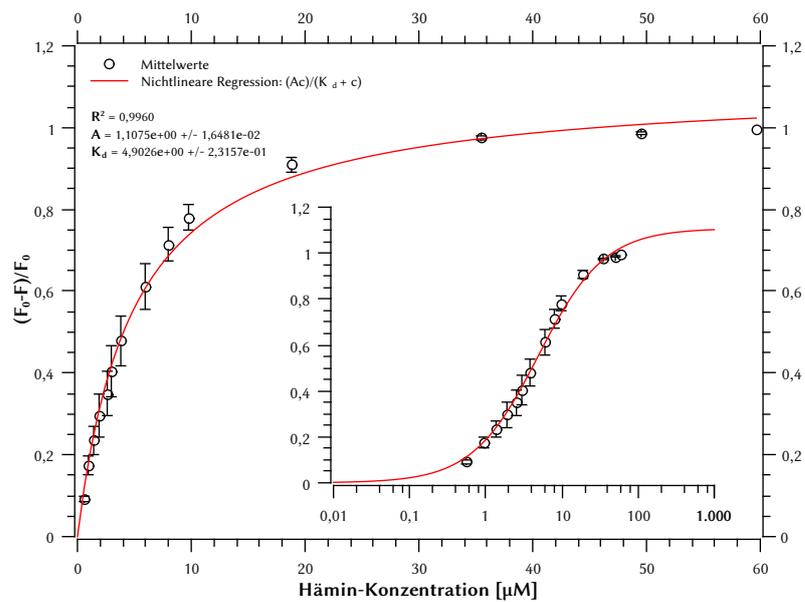


Abbildung 4.9: Häminkonzentration im Fluoreszenz-Assay; Aufgetragen sind die relative Intensität des Fluoreszenzsignals gegen die Häminkonzentration. Letztere wurde aus einer Absorptionmessung mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten ermittelt. Das Inset zeigt eine halblogarithmische Auftragung der Daten. In beiden Auftragungen zeigt sich das Erreichen der Sättigung.

4.6 CD-Spektroskopie

Die Daten der CD-Spektren von RTE1 mit und ohne Hämin stammen aus unterschiedlichen Präparationen, da während der Messung von RTE1 mit Hämin ein Defekt an der Küvette und später am Spektrometer auftrat, so dass die Probe mit RTE1 ohne Hämin aus derselben Präparation nicht mehr gemessen werden konnte. Zum Vergleich wurden daher Daten aus einer vorangegangenen Messung von RTE1 ohne Hämin unter identischen Bedingungen herangezogen. Abbildung 4.10 zeigt beide Spektren nach Abzug der Pufferspektren von den Rohdaten.

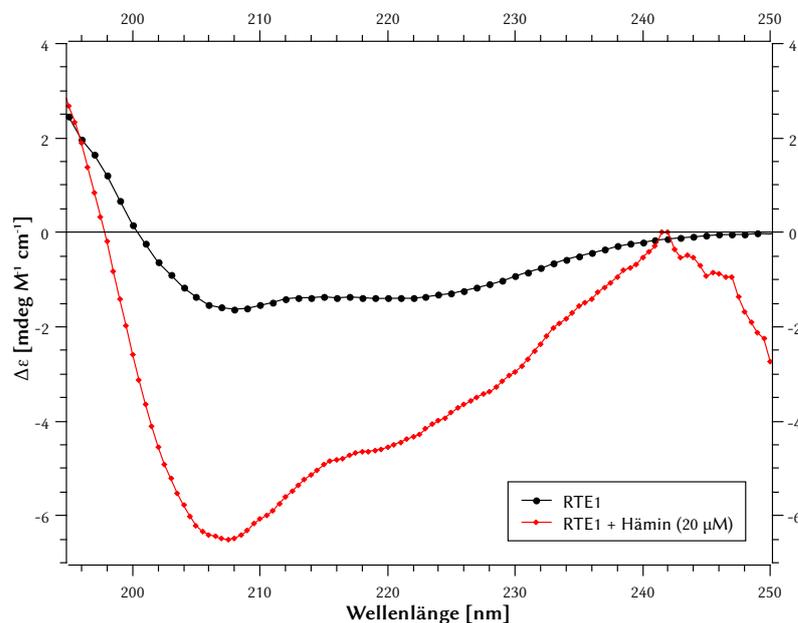


Abbildung 4.10: CD-Spektren von gereinigtem RTE1; Die Daten stammen von unterschiedlichen Präparationen von RTE1. RTE1 wurde in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer mit 0,003 % (w/v) Fos-Cholin 16[®] gelöst. Die Proteinkonzentration betrug 0,05 mg mL⁻¹. Die Spektren wurden mit einer Auflösung von 0,5 nm (RTE1 + Hämin) bzw. 1 nm (RTE1) und 20 nm min⁻¹ aufgenommen. Es wurden jeweils 15 Spektren akkumuliert. Deutlich ist in beiden Fällen ein negativer Cotton-Effekt bei etwa 207 nm zu erkennen, welcher charakteristisch für α -helikale Strukturanteile ist. Der α -helikale Anteil ist bei Häminzugabe deutlich erhöht.

Anhand der CD-Spektren wurde eine Sekundärstrukturanalyse mit *CONTINLL* (Provencher u. Gloeckner, 1981) durchgeführt. Sie ergab für RTE1 ohne Häminzugabe einen Sekundärstrukturanteil von 18 % α -Helix, 30 % β -Faltblatt, 22 % β -Schleife

und 30 % *Random Coil*. Bei Zugabe von Hämin ergibt die Strukturvorhersage Anteile von 44 % α -Helix, 6 % β -Faltblatt, 25 % β -Schleife und 25 % *Random Coil*. Es zeigt sich also ein höherer Anteil von α -Helices und ein geringerer Anteil β -Faltblättern.

5 Diskussion

Abbildungsverzeichnis

2.1	Ethylensynthese und Yang-Zyklus	6
2.2	Ethylen-Signalweg	8
2.3	Modell des Signalzustandes von ETR1	10
3.1	Vektorkarte von pET-15b-RTE1	20
3.2	Struktur des Hämins	27
4.1	SDS-PAGE der native Reinigung von RTE1	33
4.2	Westernblot der nativen Reinigung von RTE1	33
4.3	SDS-PAGE der denaturierenden Reinigung von RTE1	34
4.4	SDS-PAGE eines Häminagarose-Assays	35
4.5	Spezifität der Hämin-Bindung	36
4.6	Differenzspektren des photometrischen Bindungsassays	37
4.7	Relative Verschiebung der Absorptionsmaxima	39
4.8	Emissionsspektrum des Fluoreszenz-Assays	40
4.9	Häminbindung im Fluoreszenz-Assay	41
4.10	CD-Spektren von gereinigtem RTE1	42

Tabellenverzeichnis

3.2	Pipettierschema für SDS-Gele	23
3.3	Silberfärbung von Polyacrylamidgelen	24
3.4	Pipettierschema für BCA-Kalibriergerade	26
3.5	Pipettierschema für BCA-Proben	26
3.6	Hämin-Konzentration für die UV-Vis-Spektroskopie	28
3.7	Hämin-Konzentration für die Fluoreszenzspektroskopie	30

Literaturverzeichnis

- [Atkins u. de Paula 2006] ATKINS, Peter W. ; PAULA, Julio de: *Physikalische Chemie*. 4., vollst. überarb. Aufl. Weinheim : Wiley-VCH, 2006. – ISBN 9783527315468
- [Chang 2009] CHANG, C.: [*mündlich, unveröffentlicht*]. 2009
- [Dong u. a. 2004] DONG, X. ; STOTHARD, P. ; FORSYTHE, I. J. ; WISHART, D. S.: Plasmapper: a web server for drawing and auto-annotating plasmid maps. In: *Nucleic Acids Research* 32 (2004), Nr. Web Server, W660–W664. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkh410>. – DOI 10.1093/nar/gkh410. – ISSN 0305–1048
- [Duncan u. a. 1999] DUNCAN, T. ; OSAWA, Y. ; KUTTY, R. K. ; KUTTY, G. ; WIGGERT, B.: Heme-binding by Drosophila retinoid-and fatty acid-binding glycoprotein (RFABG), a member of the proapolipoprotein gene family. In: *The Journal of Lipid Research* 40 (1999), Nr. 7, S. 1222
- [Fischer 1999] FISCHER, H.: On haemin and the relationships between haemin and chlorophyll. In: *Nobel lectures in chemistry, 1922-1941* (1999), S. 165
- [Kendrick u. Chang 2008] KENDRICK, M ; CHANG, C: Ethylene signaling: new levels of complexity and regulation. In: *Current Opinion in Plant Biology* 11 (2008), Nr. 5, 479–485. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2008.06.011>. – DOI 10.1016/j.pbi.2008.06.011. – ISSN 13695266
- [Laemmli 1970] LAEMMLI, U. K.: Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (1970), Nr. 5259, 680–685. <http://dx.doi.org/10.1038/227680a0>. – DOI 10.1038/227680a0. – ISSN 0028–0836

- [Lottspeich 2006] LOTTSPPEICH, Friedrich: *Bioanalytik*. 2. Aufl. München ; Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag, 2006. – ISBN 9783827415202
- [Malach 2009] MALACH, Anuschka: *Expression und Reinigung von RTE1 aus Arabidopsis thaliana [Diplomarbeit, unveröffentlicht]*. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2009
- [Provencher u. Gloeckner 1981] PROVENCHER, Stephen W. ; GLOECKNER, Juer-gen: Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. In: *Biochemistry* 20 (1981), Nr. 1, 33–37. <http://dx.doi.org/10.1021/bi00504a006>. – DOI 10.1021/bi00504a006. – ISSN 0006–2960
- [Resnick u. a. 2008] RESNICK, J. S. ; RIVAROLA, M. ; CHANG, C.: Involvement of RTE1 in conformational changes promoting ETR1 ethylene receptor signaling in Arabidopsis. In: *The Plant journal: for cell and molecular biology* 56 (2008), Nr. 3, S. 423
- [Resnick u. a. 2006] RESNICK, J. S. ; WEN, C. K. ; SHOCKEY, J. A. ; CHANG, C.: REVERSION-TO-ETHYLENE SENSITIVITY1, a conserved gene that regulates ethylene receptor function in Arabidopsis, 2006
- [Smith u. a. 1985] SMITH, P ; KROHN, R ; HERMANSON, G ; MALLIA, A ; GARTNER, F ; PROVENZANO, M ; FUJIMOTO, E ; GOEKE, N ; OLSON, B ; KLENK, D: Measurement of protein using bicinchoninic acid. In: *Analytical Biochemistry* 150 (1985), Nr. 1, 76–85. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7). – DOI 10.1016/0003-2697(85)90442-7. – ISSN 00032697
- [Taiz u. Zeiger 2007] TAIZ, Lincoln ; ZEIGER, Eduardo: *Plant physiology das Original mit Übersetzungshilfen*. 4. ed. München; Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag, 2007. – ISBN 9783827418654
- [Tsutsui u. Mueller 1982] TSUTSUI, K. ; MUELLER, G. C.: Affinity chromatography of heme-binding proteins: an improved method for the synthesis of hemin-agarose. In: *Analytical Biochemistry* 121 (1982), Nr. 2, S. 244–250

- [Vincent u. Muller-Eberhard 1985] VINCENT, Styliani H. ; MULLER-EBERHARD, Ursula: A Protein of the Z Class of Liver Cytosolic Proteins in the Rat That Preferentially Binds Heme. In: *The Journal of Biological Chemistry* 260 (1985), Nr. 27, 14521–14528. <http://www.jbc.org/content/260/27/14521.full.pdf+html?sid=e76840b8-53e3-41f7-b398-8005fb22d700>
- [Voet-van-Vormizeele u. Groth 2008] VOET-VAN-VORMIZEELE, Jan ; GROTH, Georg: Mutants, molecules and mechanisms - Deciphering the ethylene signalling network. In: *Current Topics in Biochemical Research* 10 (2008), Nr. 2, S. 25–34. – ISSN 09724583
- [Wiechelman 1988] WIECHELMAN, K: Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. In: *Analytical Biochemistry* 175 (1988), Nr. 1, 231–237. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90383-1](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(88)90383-1). – DOI 10.1016/0003-2697(88)90383-1. – ISSN 00032697

Abkürzungsverzeichnis

AA/BAA	Acrylamid/Bisacrylamid
ACC	1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure
AdoMet	Adenosylmethionin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
A. thaliana	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BisTris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Circulardichronismus
cmc	<i>critical micelle concentration</i> , kritische Mizellenkonzentration
CTR1	<i>CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1</i>
CV	<i>column volume</i> , Säulenvolumen
DTT	Dithiothreitol
EBF1	<i>EIN3 BINDING FACTOR 1</i>
EBF2	<i>EIN3 BINDING FACTOR 2</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EIL1	<i>ETHYLENE INSENSITIVE3 LIKE 1</i>
EIN2	<i>ETHYLENE INSENSITIVE 2</i>
EIN3	<i>ETHYLENE INSENSITIVE 3</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERF1	<i>ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1</i>
ETR1	<i>ETHYLENE RESISTANT 1</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
IDA	Iminodiessigsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid

MAP	<i>mitogen activated protein</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
p. a.	<i>pro analysi</i> (lat.), für die Analyse
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
RAN1	<i>RESPONSIVE TO ANTAGONIST 1</i>
RTE1	<i>REVERSION TO ETHYLENE 1</i>
RTH	<i>RTE1-HOMOLOG</i>
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	<i>sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan