



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 |
| 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 | Kulturmedien | 15 |
| 3.1.9 | Puffer und Lösungen für die native Reinigung | 15 |
| 3.1.10 | Puffer und Lösungen für die denaturierende Reinigung | 16 |
| 3.1.11 | Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE | 16 |
| 3.1.12 | Puffer und Lösungen für den Westernblot | 17 |
| 3.1.13 | Puffer und Lösungen für den Nachweis der Häminbindung | 18 |
| 3.2 | Methoden | 18 |
| 3.2.1 | Transformation in <i>E. coli</i> | 18 |
| 3.2.2 | Expression in <i>E. coli</i> | 20 |
| 3.2.3 | Zellaufschluss | 20 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.2.4 | Native Reinigung | 20 |
| 3.2.5 | Denaturierende Reinigung | 21 |
| 3.2.6 | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese | 22 |
| 3.2.7 | Silberfärbung | 23 |
| 3.2.8 | Westernblot und immunologischer Nachweis von Proteinen | 23 |
| 3.2.9 | Proteinbestimmung über einen Bicinchoninsäure-Assay . | 24 |
| 3.2.10 | Nachweis der Häm-inbindung | 25 |
| 4 | Ergebnisse | 31 |
| 5 | Diskussion | 32 |
| | Abbildungsverzeichnis | 33 |
| | Tabellenverzeichnis | 34 |
| | Literaturverzeichnis | 35 |

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 5³-Methylthioadenosin wird im Yang-Zyklus Methionin regeneriert (vgl. Abbildung 2.1).

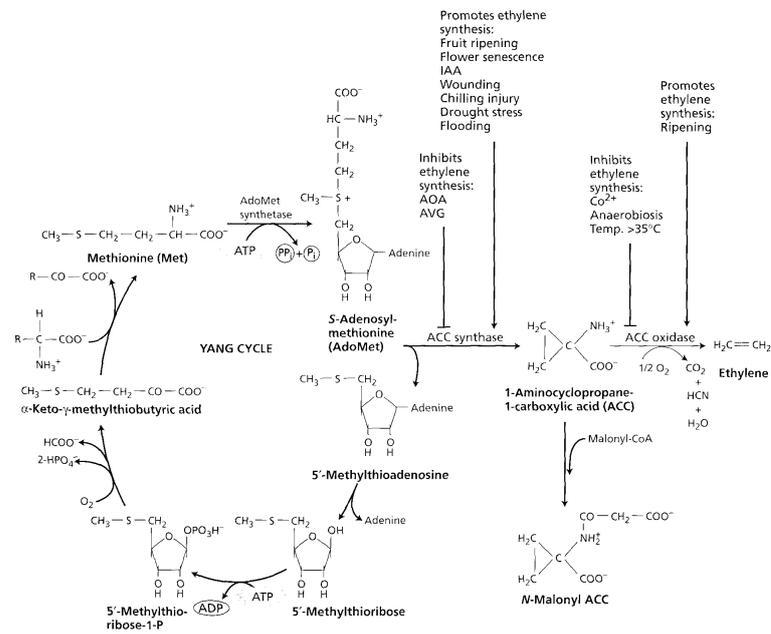


Abbildung 2.1: Ethylensynthese ausgehend von Methionin und Regeneration von Methionin im Yang-Zyklus (Taiz u. Zeiger, 2007)

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).

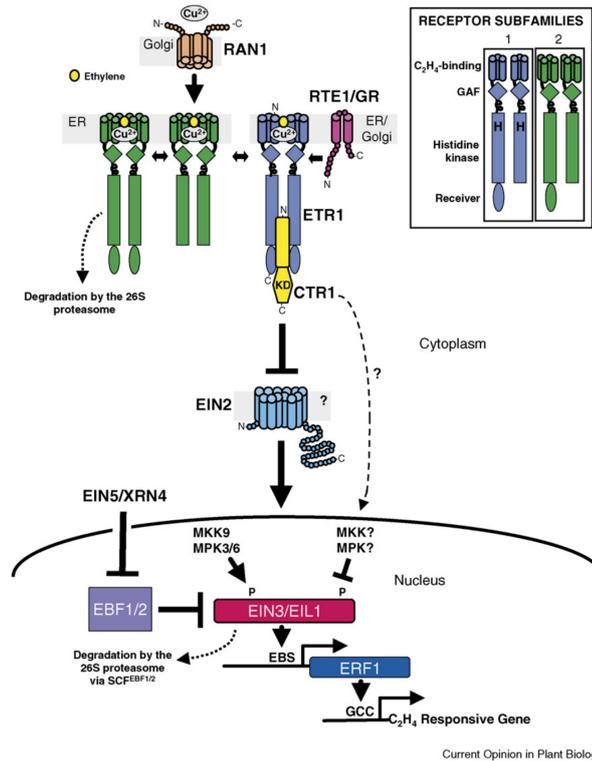


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Ethylen-Signalweges (Kendrick u. Chang, 2008)

2.3 RTE1 im Ethylensignalweg

Bei *REVERSION TO ETHYLENE 1* (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 Ethyleninsensitiven 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 *rte1-2* 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).

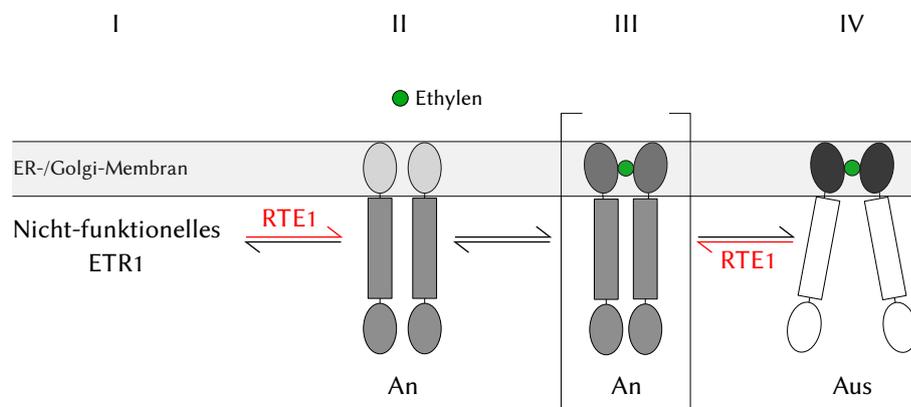


Abbildung 2.3: Modell des Signalzustandes von ETR1 (eigene Abbildung nach Resnick u. a., 2008)

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 Ausnahme 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).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Hilfsmittel

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|-----------------------------------|
| Analysen-/Präzisionswaagen | Sartorius, Göttingen |
| Autoklav | H+P Labortechnik, Oberschleißheim |
| Automatische Pipetten | Gilson, Bad Camberg |
| CD-Spektrometer J-715 | JASCO Corp., Gross-Umstadt |
| 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 Analyzer) | 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, Erlangen |
| 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 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

3.1.9 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

3.1.10 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

3.1.11 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

3.1.12 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

3.1.13 Puffer und Lösungen für den Nachweis der Häminbindung

Häminlösung (1,1 mM)

1 mg Hämin
50 μ L 1 M NaOH
ad 1,39 mL dH₂O

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.

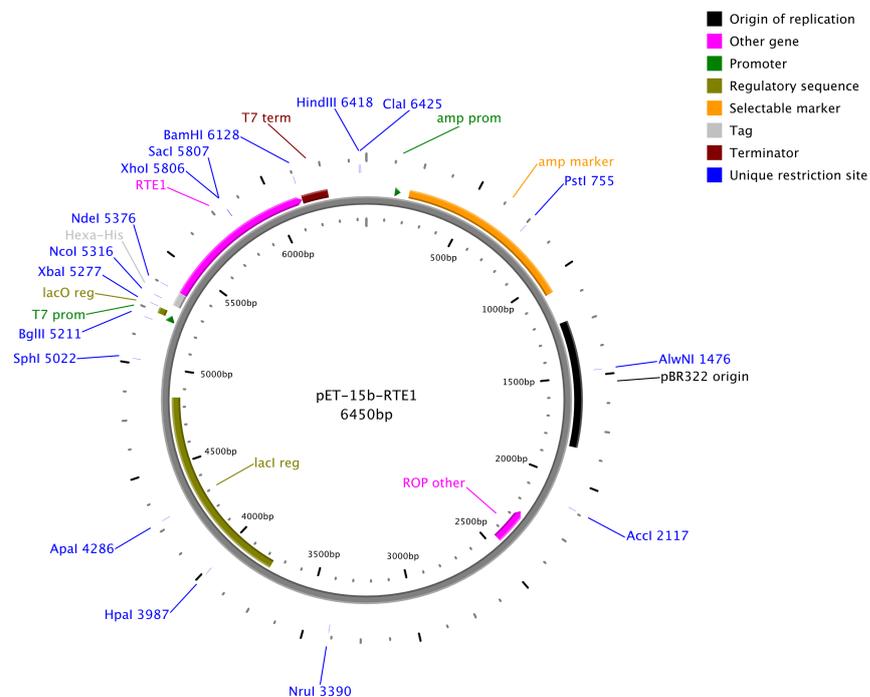


Abbildung 3.1: Vektorkarte von pET-15b-RTE1. RTE1 ist rosa markiert und befindet sich zwischen Position 5377 und 6142. Die Vektorkarte wurde mit PlasMapper (Dong u. a., 2004) erstellt.

Die Transformation erfolgte mittels einer Hitzeschocktransformation: 50 μL chemisch kompetente Zellen wurden 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.

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 μL Ampicillin-Lösung versetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die Hauptkulturen mit einem Volumen von 500 mL 2YT-Medium in schikaniereten 1 L-Kolben wurden mit 500 μL 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 Iminodisäure (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 versetzt. Die Solubilisierung erfolgte 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 Waschschriffe 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.

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 Zellysate 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 Säulenmate-

rial 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 Größenordnung 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 Waschschrte 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°C auf einem Taumelschüttler inkubiert. Am nächsten Tag erfolgten wiederum zwei Waschschrte 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 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 Ansätze 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.

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 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| BCA-Reagenz [µL] | 990 | 989 | 988 | 987 | 986 | 985 |

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 Chlorid-Ion 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,

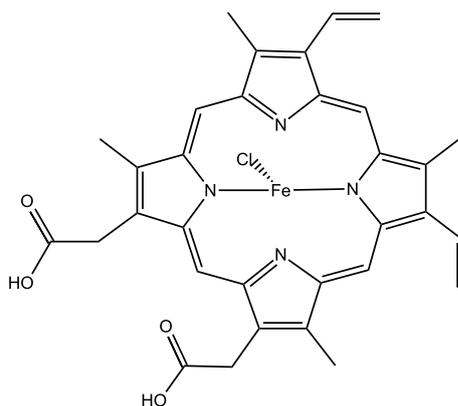


Abbildung 3.2: Struktur des Hämins (eigene Darstellung)

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.

Affinitätschromatographie mit Hämin-Agarose

Beim affinitätschromatographischen Nachweis wurde ein Säulenmaterial eingesetzt, bei welchem Hämin kovalent an Agarose als Trägermatrix gebunden ist. Hämin-bindende Proteine können dann an das immobilisierte Hämin binden. Die Elution kann entweder über die Zugabe von freiem Hämin, welches mit dem immobilisierten Hämin 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 μ L Hämin-Agarose-Suspension wurden in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben und drei Mal mit jeweils 150 μ L NP-Puffer mit 0,003 % Fos-Cholin[®] 16 im Thermoschüttler bei 20 °C unter Schütteln äquilibriert. Zum Sedimentieren der Agarose-Beads wurden die Reaktionsgefäße 10 s bei 2000 x g zentrifugiert.

Nach dem Äquilibrieren wurden 50 μ L Proteinlösung auf die Beads gegeben und für 30 min bei 20 °C im Thermoschüttler unter Schütteln inkubiert. Es schlossen sich drei Waschschrte mit jeweils 500 μ L 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 11,1 mM Hämin-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 Rotverschiebung 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. Zusätzlich wurden Pufferspektren aufgenommen, sowohl ohne als auch mit Hämin-Zugabe. Aus den Pufferspektren wurden dann über den Exktonkoeffizienten (Datenblatt des Herstellers) die tatsächliche Hämin-Konzentration in der Küvette bestimmt. Die Auswertung erfolgte über die Differenzspektren.

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. Beispiels-

Tabelle 3.6: Häminkonzentration für die UV-Vis-Spektroskopie

| Häminkonzentration [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 |

weise 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 Häminkonzentration bis zu einer Endkonzentration von 60 μM hinzutitriert. 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 $\Delta\varepsilon$ gemessen und als Elliptizität θ angegeben. d sei die Schichtdicke und c die Konzentration c angegeben (Lottspeich, 2006):

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

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 $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$.

4 Ergebnisse

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 | 19 |
| 3.2 | Struktur des Hämins | 26 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|-----|--|----|
| 3.2 | Pipettierschema für SDS-Gele | 22 |
| 3.3 | Silberfärbung von Polyacrylamidgelen | 23 |
| 3.4 | Pipettierschema für BCA-Kalibriergerade | 25 |
| 3.5 | Pipettierschema für BCA-Proben | 25 |
| 3.6 | Hämin-Konzentration für die UV-Vis-Spektroskopie | 28 |
| 3.7 | Hämin-Konzentration für die Fluoreszenzspektroskopie | 29 |

Literaturverzeichnis

- [Atkins u. de Paula 2006] ATKINS, Peter W. ; PAULA, Julio de: *Physikalische Chemie*. 4., vollst. überarb. Aufl. Weinheim : Wiley-VCH, 2006. – ISBN 9783527315468
- [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] LOTTSPEICH, 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
- [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 net-

work. 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 |
| <i>A. thaliana</i> | <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 |
| dNTP | desoxyribo-Nukleinsäure-Triphosphat |
| DTT | Dithiothreitol |
| EBF1 | <i>EIN3 BINDING FACTOR 1</i> |
| EBF2 | <i>EIN3 BINDING FACTOR 2</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| <i>E. coli</i> | <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> |
| GR | <i>GREEN RIPE</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 |