



Institut für Biochemie der Pflanzen
Abteilung für biochemische Pflanzenphysiologie

Bachelorarbeit

Molekulare Charakterisierung des Membranproteins 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

Meinem Großvater

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	5
2. Einleitung	7
2.1. Das Phytohormon Ethylen	7
2.2. Ethylensignalweg	9
2.3. RTE1 im Ethylensignalweg	11
2.4. Zielsetzung	14
3. Material und Methoden	15
3.1. Material	15
3.1.1. Geräte und Hilfsmittel	15
3.1.2. Verbrauchsmaterialien	16
3.1.3. Standards für Proteinbestimmung und SDS-PAGE	16
3.1.4. Chemikalien	17
3.1.5. Antibiotika-Stammlösungen	18
3.1.6. Antikörper	18
3.1.7. Kommerzielle Kits	18
3.1.8. Bakterienstämme	18
3.1.9. Kulturmedien	19
3.1.10. Puffer für den Zellaufschluss	19
3.1.11. Puffer und Lösungen für die native Reinigung	19
3.1.12. Puffer und Lösungen für die denaturierende Reinigung	20
3.1.13. Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE	20
3.1.14. Puffer und Lösungen für den Westernblot	21
3.1.15. Puffer und Lösungen für den Nachweis der Häminbindung	22
3.2. Methoden	23
3.2.1. Transformation in <i>E. coli</i>	23
3.2.2. Expression in <i>E. coli</i>	25
3.2.3. Zellaufschluss	25
3.2.4. Native Reinigung	25
3.2.5. Denaturierende Reinigung	26

Inhaltsverzeichnis

3.2.6.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	27
3.2.7.	Silberfärbung	27
3.2.8.	Westernblot und immunologischer Nachweis von Proteinen	28
3.2.9.	Proteinbestimmung über Bicinchoninsäure-Assay	29
3.2.10.	Nachweis der Häminbindung	31
4.	Ergebnisse	37
4.1.	Native Reinigung von RTE1	37
4.2.	Denaturierende Reinigung von RTE1	39
4.3.	Häminagarose-Assay	40
4.4.	Photometrischer Bindungsassay	42
4.5.	Fluoreszenzspektroskopischer Nachweis der Häminbindung	45
4.6.	Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie	47
5.	Diskussion	49
5.1.	Nachweis und Quantifizierung der Häminbindung	49
5.2.	Spezifität der Häminbindung	52
5.3.	Ausblick	52
	Abbildungsverzeichnis	54
	Tabellenverzeichnis	55
	Literaturverzeichnis	56
A.	Ergänzendes Material	62
A.1.	Nukleotid- und Aminosäuresequenzen	62
A.2.	Strukturvorhersage	64
B.	Danksagung	65
C.	Erklärung	66

1. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, eine Häminbindung von *REVERSION TO ETHYLENE 1* (RTE1), einem negativen Regulator der Ethylenantwort in *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) nachzuweisen und zu quantifizieren. Es konnten verschiedene Assays zum Nachweis und zur Quantifizierung der Häminbindung etabliert werden.

Hierfür wurde der RTE1-kodierende Genabschnitt in einen aus pET-15b abgeleiteten Vektor kloniert, in den *Escherichia coli* (*E. coli*) Stamm BL21-Gold (DE) transformiert und in diesem exprimiert. Das rekombinant hergestellte RTE1 konnte dann über einen His-Tag affinitätschromatographisch gereinigt werden.

Zum Nachweis einer Häminbindung kam zunächst ein Häminagaroseassay zum Einsatz. Hämin ist hierbei an einer Agarosematrix immobilisiert und kann mit RTE1 in Lösung interagieren. Die Elution von gebundenem RTE1 erfolgte denaturierend oder unter Zugabe von freiem Hämin. In beiden Fällen ließ sich eine Bindung nachweisen.

Darüberhinaus wurden Messungen im UV-Vis-Spektrophotometer durchgeführt. RTE1 mit gebundenem Hämin zeigt hier einen Absorptionsanstieg im Soret-Band bei gleichzeitiger Blauverschiebung, wobei letztere für die Bestimmung eines K_d -Wertes herangezogen wurde. Im Fluoreszenzspektrometer führt die Zugabe von Hämin zu einem Quench der Tryptophanfluoreszenz, welcher ebenfalls zur K_d -Bestimmung ausgewertet wurde. Beide Methoden ergaben für pH 7,5 einen K_d von $(7,24 \pm 2,23) \mu\text{M}$ (UV-Vis) bzw. $(4,90 \pm 0,23) \mu\text{M}$ (Fluoreszenz). Es zeigte sich auch, dass die Bindungsaffinität bei saurem pH deutlich geringer ist, als bei physiologischem oder leicht alkalischen pH. Schließlich konnte mit Hilfe der CD-

1. Zusammenfassung

Spektroskopie gezeigt werden, dass die Zugabe von Hämin eine Veränderung der Sekundärstruktur hin zu deutlich höherem α -helikalem Strukturanteil zur Folge hat.

Die etablierten Bindungsassays können in zukünftigen Versuchen Hinweise – beispielsweise zur erfolgreichen Renaturierung von denaturierend gereinigtem RTE1 – liefern.

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).

2. Einleitung

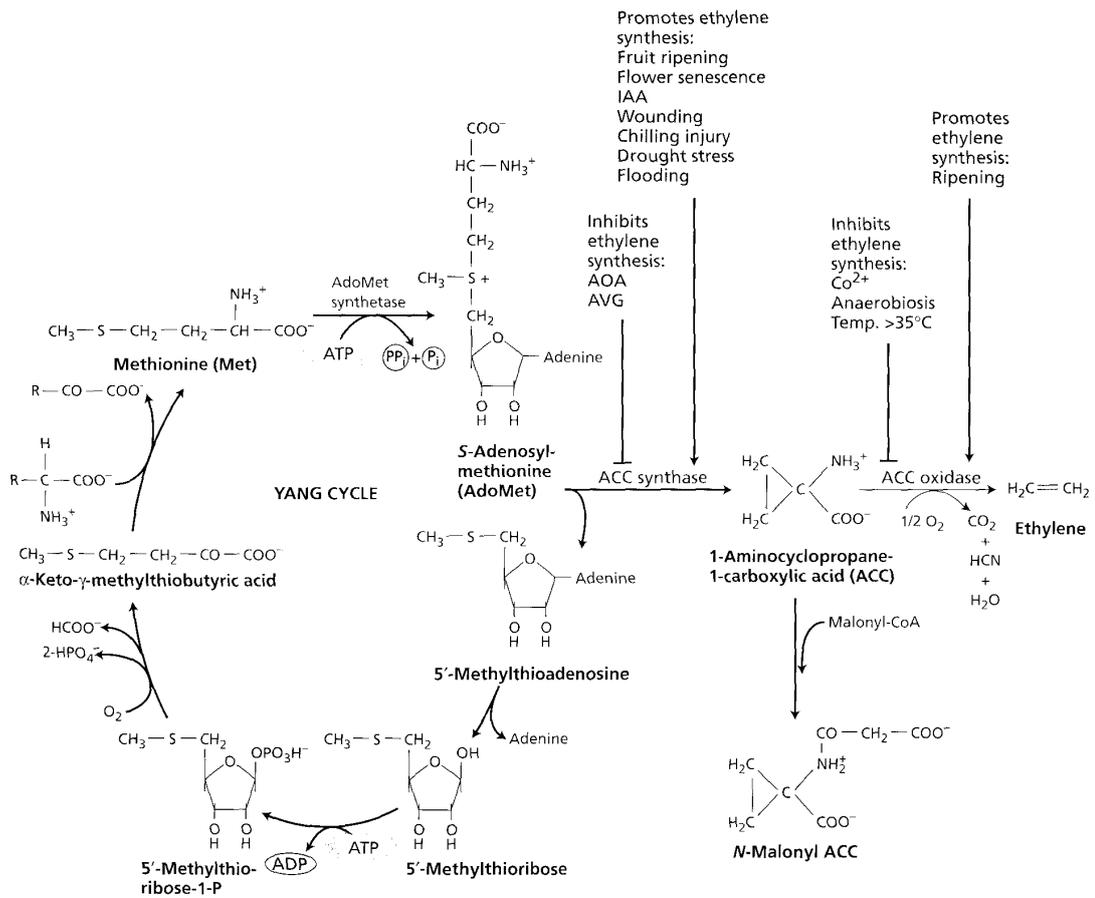


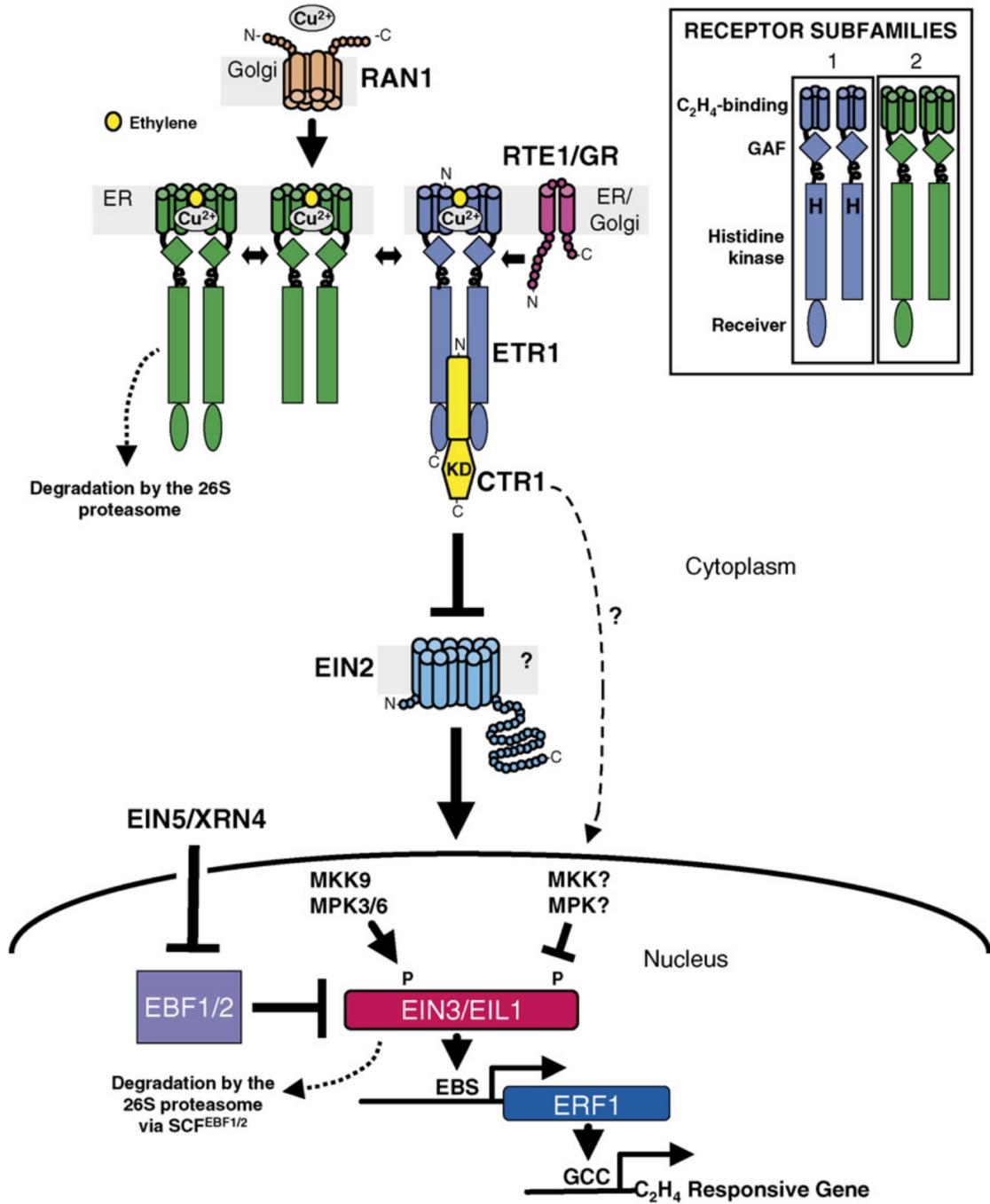
Abbildung 2.1.: Ethylensynthese ausgehend von Methionin und Regeneration von Methionin im Yang-Zyklus (Taiz u. Zeiger, 2007)

2.2. Ethylensignalweg

Die Ethylenwahrnehmung geschieht über in die Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) integrierte Ethylenrezeptoren, welche dort Homo- und Heterodimere ausbilden können (Resnick et al., 2008). Als kleines, hydrophobes Molekül kann Ethylen die Zellmembran durchqueren und bindet über den Kofaktor Kupfer innerhalb der Transmembrandomäne dieser Rezeptoren. Für die Lokalisierung des Kofaktors Kupfer zeichnet *RESPONSIVE TO ANTAGONIST 1* (RAN1), ein Kupfertransporter, verantwortlich. Durch die Bindung von Ethylen wird die nachgeschaltete MAP-Kinase-Kinase-Kinase *CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1* (CTR1) inaktiviert. 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 *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 et al., 2008).

2. Einleitung



Current Opinion in Plant Biology

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 (MW Monomer: 28 kDa), welches kolokalisiert mit dem Ethylenrezeptor *ETHYLENE RESISTANT 1* (ETR1) in der Membran des Golgi-Apparates bzw. des ER vorliegt (Resnick et al., 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 et al., 2008).

Durch Mutagenese wurden Keimlinge 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 et al., 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 et al., 2008).

Weitere Versuche zeigten, dass eine Überexpression von RTE1 im Wildtyp zu

2. Einleitung

einer verminderten Ethylensensitivität führt, was die Annahme stützte, dass es sich bei RTE1 um einen negativen Regulator der Ethylenantwort handelt (Resnick et al., 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 et al., 2008). So ist die Funktion von ETR1 im Wildtyp sowohl von RTE1 als auch von RAN1 abhängig, in *etr1-2* hingegen nur von RTE1. Hiervon ausgehend wurde das nachfolgend dargestellte (Abbildung 2.3) Modell zum Signalzustand von ETR1 vorgeschlagen (Resnick et al., 2008).

Nach diesem Modell reguliert die Ethylenantwort über eine Konformationsänderung der Ethylen-Bindedomäne des Rezeptors ETR1 (Abbildung 2.3). Hierfür wurden zwei unterschiedliche Möglichkeiten vorgeschlagen. Die erste besagt, dass ETR1 von einer nicht-funktionellen Konformation mit Hilfe von RTE1 in eine funktionelle Konformation übergeht, 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 intermediäre Konformation übergeht, welche ebenfalls den „an“-Zustand repräsentiert und schließlich durch eine Konformationsänderung in den „aus“-Zustand wechselt. Die zweite Möglichkeit beinhaltet, dass RTE1 am Übergang von ETR1 aus der inaktiven Form mit gebundenem Ethylen in den intermediären Zustand beteiligt ist. In beiden Möglichkeiten fördert RTE1 den inaktiven Zustand (Resnick et al., 2008).

Resnick et al. (2008) schlagen vor, dass RTE1 nach der ersten beschriebenen Möglichkeit wirkt und begründen dies mit der phänotypischen Ähnlichkeit von *rte1 loss-of-function*-Mutationen mit der *etr1*-Nullmutante. Der nicht-funktionelle Grundzustand von ETR1 entspräche dann phänotypisch der *etr1*-Nullmutante.

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 et al., 2006). Nach bisherigem Kenntnisstand verfügen die genannten Spezies über jeweils eine Kopie des Gens, mit Ausnahme von *A. thaliana*, bei welcher sich eine

2. Einleitung

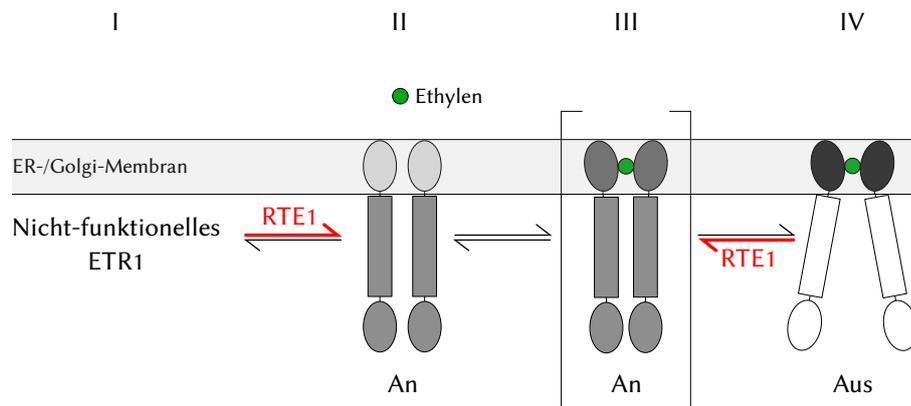


Abbildung 2.3.: Modell des Signalzustandes von ETR1 (eigene Abbildung nach Resnick et al., 2008); Es wurden zwei mögliche Wirkungsweisen von RTE1 auf ETR1 vorgeschlagen: Nach der ersten Möglichkeit bewirkt RTE1 den Übergang von ETR1 von einer nicht-funktionellen (I) in eine funktionelle Konformation (II). Diese spiegelt den „an“-Zustand des Rezeptors wider. Wird Ethylen gebunden, geht der Rezeptor in einen intermediären Zustand (III) über, aus welchem er in den „aus“-Zustand (IV) wechselt. Die zweite Möglichkeit beinhaltet, dass RTE1 am Übergang vom „aus“-Zustand (IV) in den intermediären Zustand (III) beteiligt ist, aus welchem ETR1 dann in zurück in den „an“-Zustand (II) wechselt. In beiden Fällen fördert RTE1 den aktiven Zustand des Rezeptors.

zweite Kopie – *RTE1-HOMOLOG* (RTH) – mit 51 % Sequenzidentität findet (Resnick et al., 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 et al., 2008) lässt jedoch auf eine essenzielle, konservierte Funktion schließen (Resnick et al., 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

2. Einleitung

hervorgerufenen – *Frameshift* die letzten 27 Aminosäurereste, welche sich in einer vorhergesagten Transmembrandomäne befinden, durch 15 inkorrekte Reste ersetzt worden. Dies führt vermutlich zu einer falschen Ausrichtung des Proteins in der Membran. Tierische Homologe zeigen in der Sequenzanalyse die ersten drei Transmembrandomänen (Resnick et al., 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 Häminbindung bereits nachgewiesen werden konnte (Chang, 2009), sollte der Fokus dieser Arbeit auf dem Nachweis und wenn möglich auch der Quantifizierung einer Häminbindung von RTE1 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
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, Schwabach
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

3. Material und Methoden

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
Häminagarose	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. Material und Methoden

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 [®] 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 (wasser- frei)	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

3. Material und Methoden

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

3.1.10. 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

3.1.11. 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. Material und Methoden

3.1.12. 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

3.1.13. 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 % (w/v) SDS

3. Material und Methoden

Sammelgelpuffer, 5x, pH 6,7

0,25 M Tris/H₃PO₄

0,5 % (w/v) SDS

Stopplösung

2,3 M Zitronensäure

Trenngelpuffer, 2,5x, pH 8,9

1,875 M Tris/H₃PO₄

0,25 % (w/v) 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

3.1.14. 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

3.1.15. 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. In der vorliegenden Arbeit wurde das Reinigungsprotokoll (vgl. 3.2.4) hinsichtlich des Durchführungsaufwands, insbesondere in Hinblick auf die Anzahl der Arbeitsschritte, optimiert.

3.2.1. Transformation in *E. coli*

Zur Transformation von *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 werden auf Eis aufgetaut und mit 1 μL Plasmid-Lösung versetzt. Anschließend wurden die Zellen für 10 min auf Eis inkubiert. Es erfolgt ein Hitzeschock bei 42 °C für 90 s. Die Zellen wurden danach 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. Material und Methoden

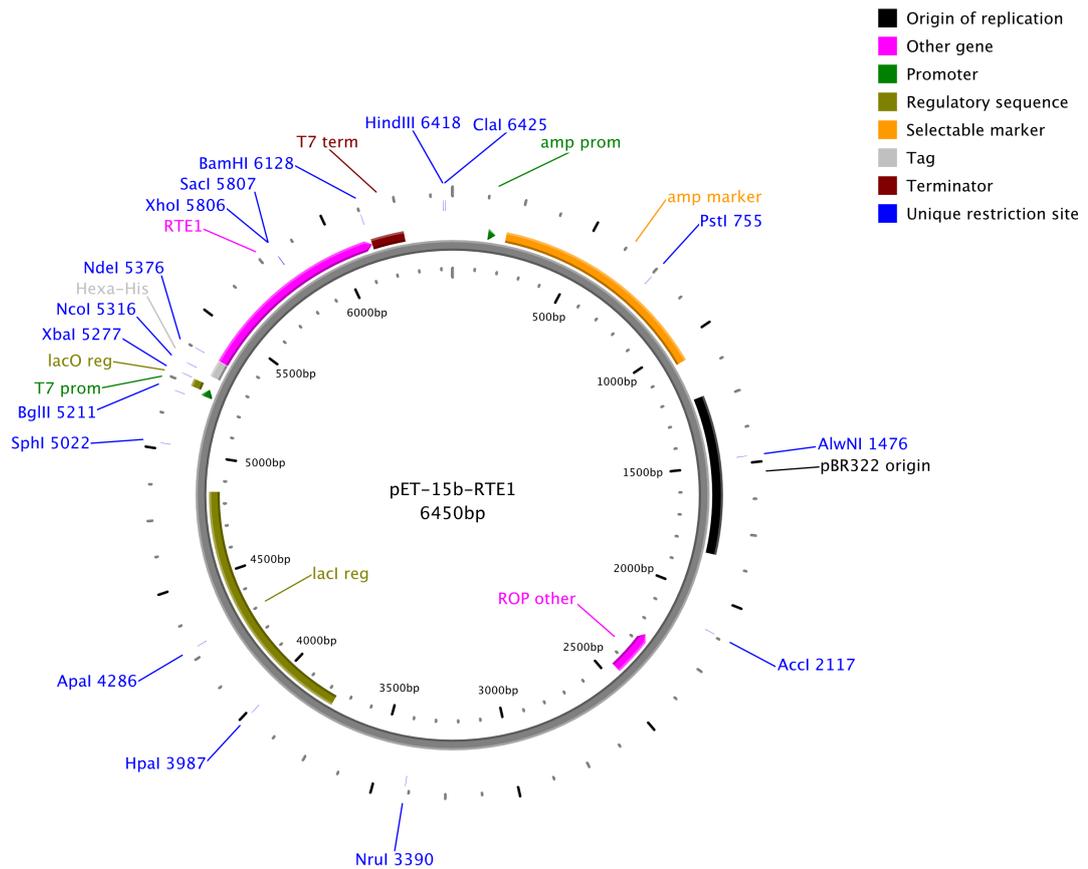


Abbildung 3.1.: Vektorkarte von pET-15b-RTE1. RTE1 ist rosa markiert und befindet sich zwischen Position 5377 und 6142. Die Vektorkarte wurde mit PlasMapper (Dong et al., 2004) erstellt.

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 schikanieren 1 L-Kolben wurden mit 500 μ L Ampicillin-Lösung versetzt und mit 5 mL der Vorkultur inokuliert. Die Induktion erfolgte bei einer OD₆₀₀ 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. Vier Stunden nach der Induktion wurden die Zellen bei 7000 x g für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert.

3.2.3. Zellaufschluss

Vier Gramm 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 Iminodisigsäure (IDA), welche an Agarose immobilisiert ist. Ni²⁺-Ionen werden von IDA dreifach koordinativ komplexiert, so dass drei Koordinationsstellen für die Interaktion der Poly-Histidin-markierten Proteine mit den immobilisierten Ni²⁺-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 Ni²⁺ zu verdrängen.

Die aufgeschlossenen Zellen (vgl. 3.2.3) wurden bei 230 000 x g für 20 min in

3. Material und Methoden

einer auf 4 °C gekühlten Ultrazentrifuge abzentrifugiert und das Pellet in 10 mL Solubilisierungspuffer resuspendiert. Der Ansatz wurde mit 1 % (w/v) Fos-Cholin 16 versetzt. 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 diese im Rahmen der vorliegenden 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 Zellysate enthaltenen Proteine denaturiert, was dazu führt, dass membran-

integrale 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 3.3 enthält ein Pipettierschema für drei kleine Gele der Größe 9 cm x 10 cm.

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

3. Material und Methoden

Tabelle 3.3.: 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 μ L	12,3 μ L
APS 10 % (w/v)	112 μ L	129 μ L

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 3.4 zu entnehmen.

Tabelle 3.4.: 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

3. Material und Methoden

kann anschließend eine Visualisierung der Proteine auf der Membran erfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit kam das Semi-Dry-Blotverfahren, sowie eine Nitrozellulosemembran mit einer Porengröße von $0,2\ \mu\text{m}$ 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 $1\ \text{mA cm}^{-2}$ 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 $4\ ^\circ\text{C}$ 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 Meerrettich-Peroxidase (HRP) mit Hilfe eines Chemilumineszenzreagenzes nachweisen. Die *horseradish peroxidase*, Meerrettich-Peroxidase (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 Bicinchoninsäure-Assay

Die Proteinkonzentration in einer Lösung kann über einen Bicinchoninsäure-Assay ermittelt werden (Smith et al., 1985). Cystein, Cystin, Tyrosin, Tryptophan

3. Material und Methoden

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 3.5 und 3.6 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 Standards für die Kalibriergerade im Vergleich zu den Proben um den Faktor 10 verdünnt wurden. Die Messung der Proben erfolgte als Dreifachbestimmung.

Tabelle 3.5.: 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 3.6.: 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 Chlorid-Ion auf. Das Hämin b des Häm b wird als Hämin bezeichnet (Fischer, 1999).

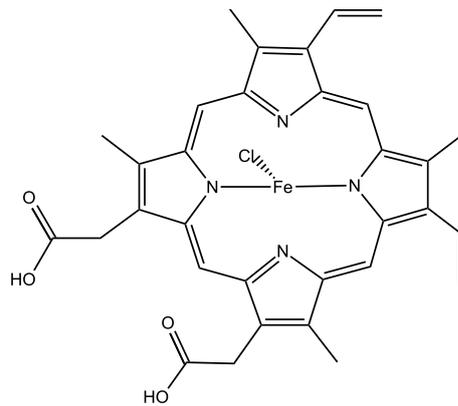


Abbildung 3.2.: Struktur des Hämins (eigene Darstellung)

Für den Nachweis einer Häminbindung durch RTE1 kamen vier unterschiedliche Methoden zum Einsatz: Eine Affinitätschromatographie mit Häminagarose, ein photometrischer Nachweis über die Zugabe von freiem Hämin, der Nachweis über einen Tryptophan-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.

Affinitätschromatographie mit Häminagarose

Beim affinitätschromatographischen Nachweis wurde ein Säulenmaterial eingesetzt, bei welchem Hämin kovalent an Agarose als Trägermatrix gebunden ist. Häm-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 denatu-

3. Material und Methoden

rierend 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-inagarose-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 äquilibriert. 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 Waschschrte 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-inlösung.

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 Verschiebung des Soret-Peaks zu beobachten, da das Protein bzw. der Protein-Häm-Komplex unterschiedliche Absorptionsmaxima aufweisen (Duncan et al., 1999). Die Bindung von Häm-in 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. Die Lösung wurde in eine Quarzglasküvette überführt und ein Absorptionsspektrum im Bereich von 300 nm bis 500 nm aufgenommen. Häm-in wurde hinzutitriert, so dass die in Tabelle 3.7 aufgeführten Endkonzentrationen erreicht wurden. Alle Messungen erfolgten bei 25 °C, je Messreihe wurden sechs Spektren aufgenommen. Zusätzlich wurden Pufferspektren aufgenommen, sowohl

3. Material und Methoden

ohne als auch mit Häminzugabe. Zur Ermittlung der tatsächlich in der Küvette vorliegenden Häminkonzentration wurde die Küvette mit 500 μL 1 M NaOH befüllt, Häminstammlösung hinzutitriert und Absorptionsspektren aufgenommen. Aus diesen konnte mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von Hämin (Datenblatt des Herstellers) die Konzentration in der Küvette bestimmt werden.

Tabelle 3.7.: 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

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 (Lakowicz, 2006). In der Proteinanalytik wird häufig Tryptophan angeregt,

3. Material und Methoden

dessen Absorptionsmaximum bei 280 nm liegt und ein Emissionsmaximum im Bereich zwischen 300 nm bis 350 nm aufweist (Lakowicz, 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 μ L mit einer Proteinkonzentration von 2,5 μ M in die Messung eingesetzt. Im Verlauf der Messung wurde Häm in bis zu einer Endkonzentration von 60 μ M 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.

3. Material und Methoden

Tabelle 3.8.: Häminkonzentration für die Fluoreszenzspektroskopie

Häminkonzentration [μM]	Volumen sug [μL]	Stammlö-	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 auf, wobei letztlich ihre Differenz $\Delta\epsilon$ gemessen und als Elliptizität θ angegeben wird – d sei die Schichtdicke und c die Konzentration (Greenfield, 2007):

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

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 (Greenfield, 2007). 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, wobei es sich vermutlich um *Inclusion-Bodies* handelt. Darüberhinaus zeigen sich Multimere unterschiedlicher Molekularität. Durchschnittlich ließen sich aus 4 g Zellen etwa 0,75 mg Protein reinigen.

4. Ergebnisse

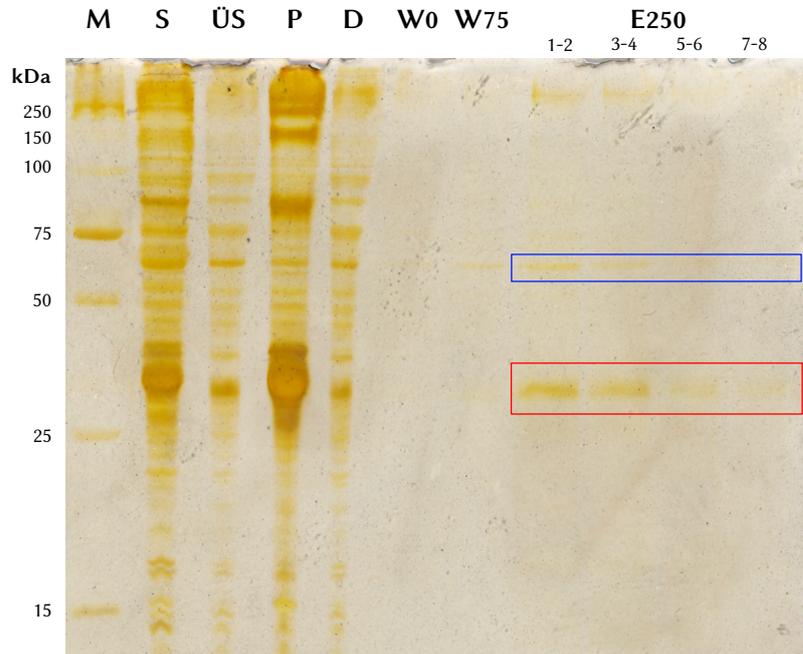


Abbildung 4.1.: SDS-PAGE der nativen Reinigung von RTE1; In der Reihenfolge des Auftrags: Marker (M), Solubilisat (S), Überstand aus Ultrazentrifugation (ÜS), Pellet aus Ultrazentrifugation (P), Durchlauf (D), Waschschrte (W0, W75), Elution (E250); Zahlen unterhalb von E250 geben die Säulenvolumen an. 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 solubilisierter Proteins (28 kDa) zu erkennen.

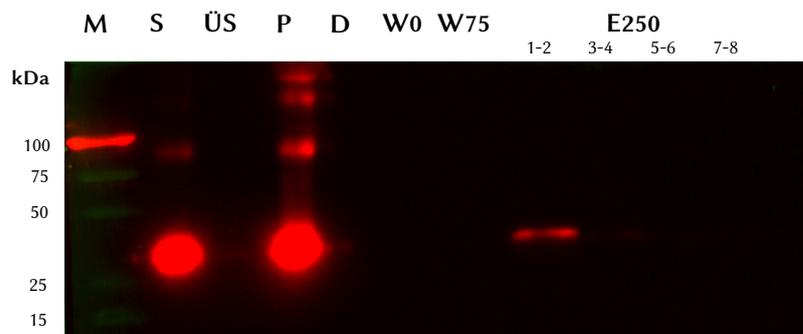


Abbildung 4.2.: Westernblot der nativen Reinigung von RTE1; In der Reihenfolge des Auftrags: Marker (M), Solubilisat (S), Überstand aus Ultrazentrifugation (ÜS), Pellet aus Ultrazentrifugation (P), Durchlauf (D), Waschschrte (W0, W75), Elution (E250); Zahlen unterhalb von E250 geben die Säulenvolumen 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 von RTE1

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 lassen sich auch *Inclusion-Bodies* solubilisieren, so dass eine größere Proteinausbeute zu erwarten ist. Das SDS-Gel zeigt entsprechend kräftigere Banden in den Elutionsfraktionen der denaturierenden Reinigung (Abbildung 4.3) im Vergleich zu denen der nativen Reinigung (Abbildung 4.1).

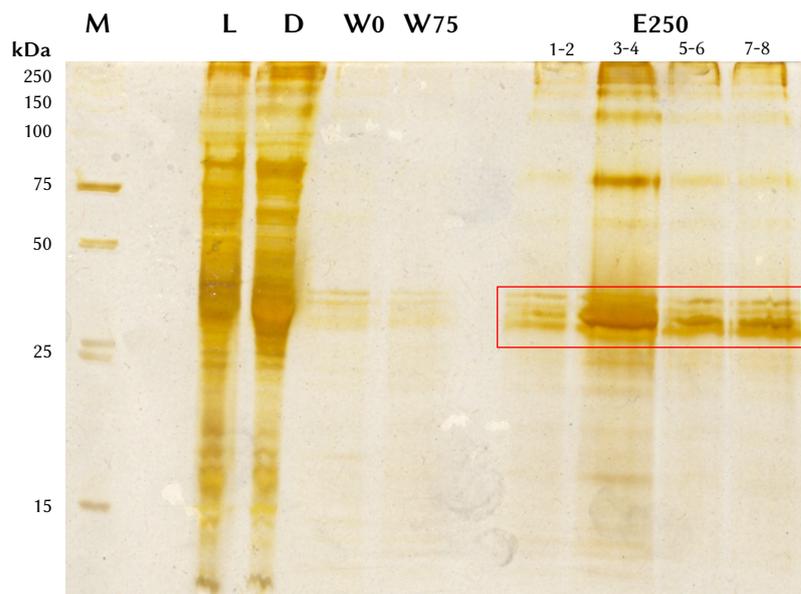


Abbildung 4.3.: SDS-PAGE der denaturierenden Reinigung von RTE1; In der Reihenfolge des Auftragens: Marker (M), Zellics (L), Durchlauf (D), Waschschritte (W0, W75), Elution (E250); Rot umrandet sind die RTE1-Bande.

4.3. Häminagarose-Assay

Das gereinigte RTE1 wurde wie unter 3.2.10 beschrieben mit Häminagarose inkubiert. Gebundenes RTE1 wurde mittels Erhitzen in 2x SDS-Probenpuffer oder über die Zugabe von Hämin eluiert. 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 4.4).

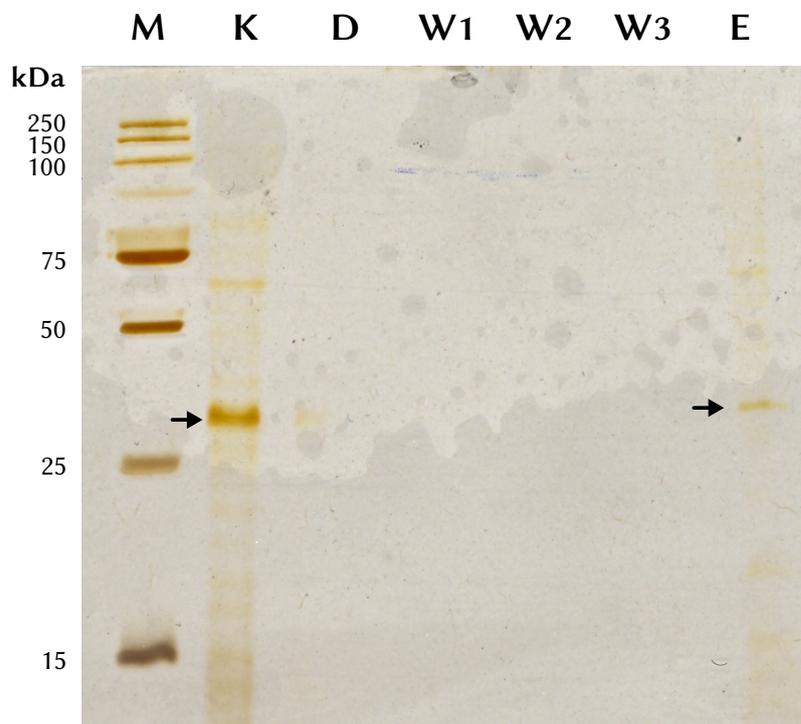


Abbildung 4.4.: SDS-PAGE eines Häminagarose-Assays; Von links nach rechts: Marker (M), Proteinkonzentrat (K), Durchlauf (D), Waschschritte (W1-3), Elution (E); Eluiert wurde mit 2x SDS-Probenpuffer und Erhitzen auf 99 °C. Die RTE1-Banden in Konzentrat und Elution sind durch Pfeile markiert. Beim Auftragen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

Um die Spezifität der Bindung nachzuweisen wurde in weiteren Versuchen zur Elution eine Lösung von freiem Hämin (11 mM) eingesetzt. Auch hier zeigte

4. Ergebnisse

sich eine – allerdings schwächere – Bande in der Elutionsfraktion. Danach noch gebundenes Protein wurde wie zuvor mit SDS-Probenpuffer und Erhitzen eluiert (Abbildung 4.5).

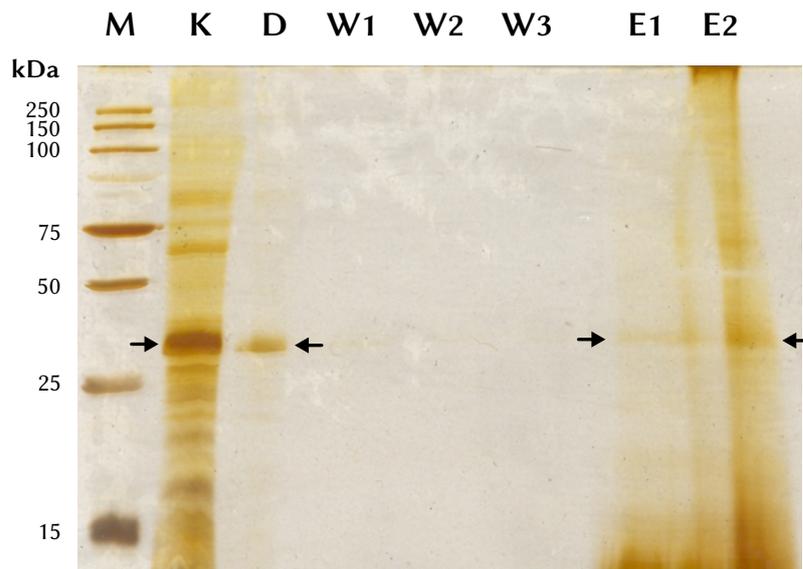


Abbildung 4.5.: Spezifität der Hämin-Bindung; Von links nach rechts: Marker (M), Proteinkonzentrat (K), Durchlauf (D), Waschschrirte (W1-3), Elutionen (E1, E2); E1 wurde mit 11 mM freiem Hämin, E2 im Anschluss an E1 mit 2x SDS-Probenpuffer und Erhitzen auf 99 °C eluiert. Die RTE1-Banden sind durch Pfeile 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.

4.4. Photometrischer Bindungsassay

Zur Analyse der Bindungseigenschaften von Hämin an RTE1 wurden drei Messreihen bei unterschiedlichen pH-Werten – pH 6,5; pH 7,5; pH 8,5 – durchgeführt. 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 $50 \mu\text{M}$ Häminlösung weist bereits eine maximale Absorption von über 3 auf, der Obergrenze laut Herstellerangaben.

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 Hämin 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. Es ergaben sich K_d -Werte von $(79,60 \pm 12,72) \mu\text{M}$ (pH 6,5), $(7,24 \pm 2,23) \mu\text{M}$ (pH 7,5) und $(8,40 \pm 1,04) \mu\text{M}$ (pH 8,5), wobei jedoch zu beachten ist, dass bei pH 6,5 die Sättigung deutlich nicht erreicht wurde. Bei pH 8,5 streuen hingegen die Messwerte im Vergleich zu pH 7,5 relativ stark.

4. Ergebnisse

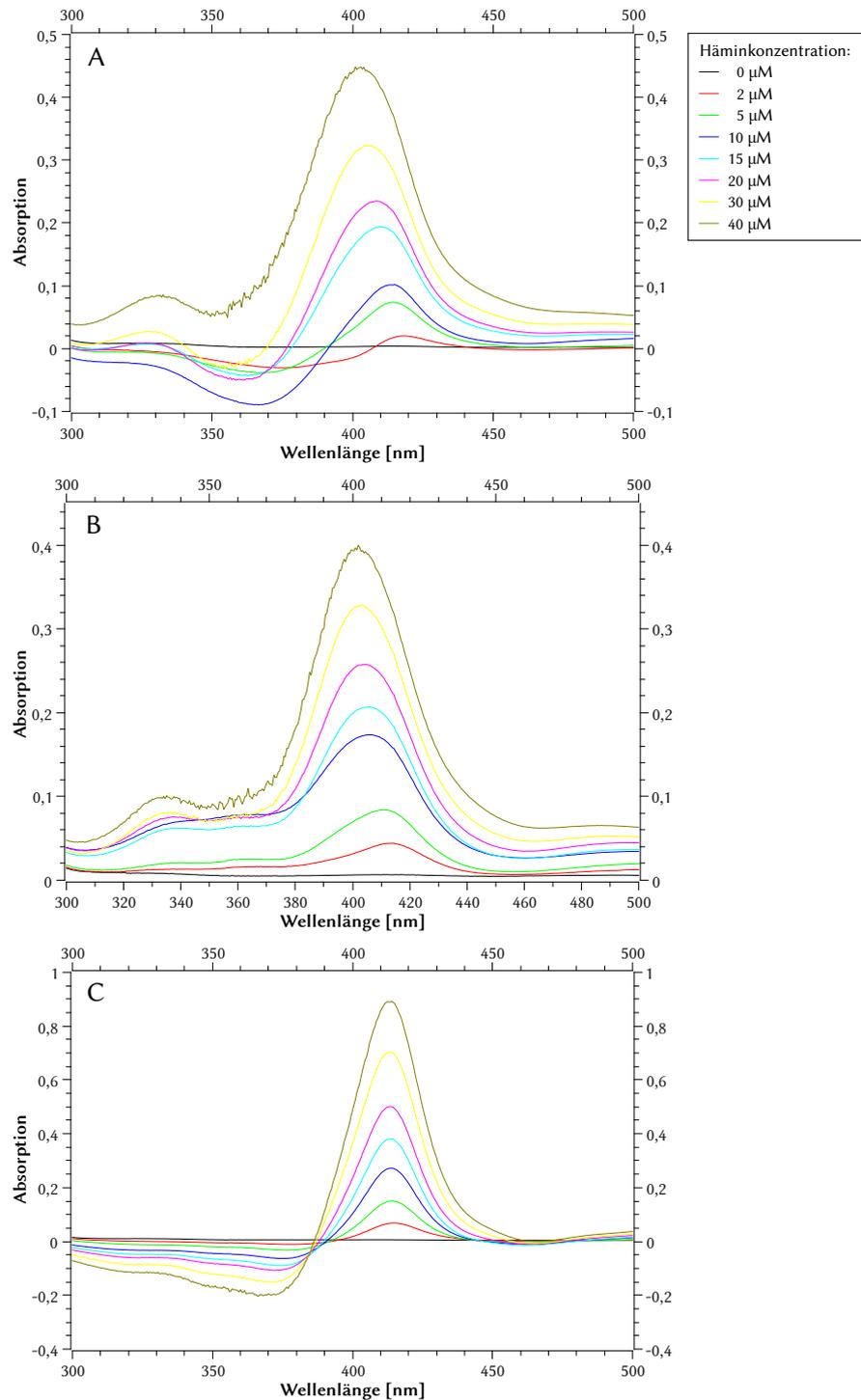


Abbildung 4.6.: Differenzspektren des photometrischen Bindungsassays bei unterschiedlichem pH-Wert: pH 6,5 (A), pH 7,5 (B) und pH 8,5 (C); Insbesondere bei pH 6,5 (A) und pH 7,5 (B) ist deutlich eine Verschiebung der Absorptionsmaxima bei höheren Häminkonzentrationen hin zu kürzeren Wellenlängen sichtbar.

4. Ergebnisse

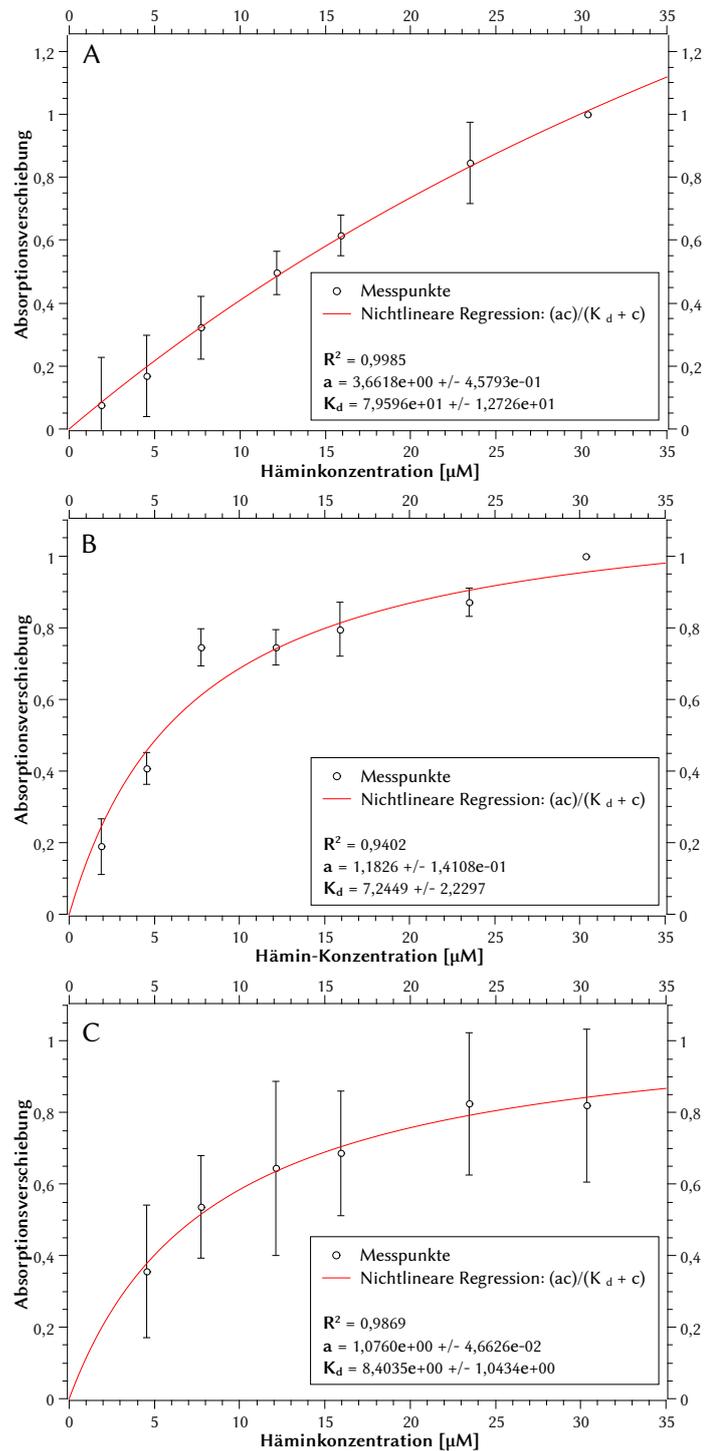


Abbildung 4.7.: Relative Verschiebung der Absorptionsmaxima; Bei pH 7,5 (B) und 8,5 (C) ist eine beginnende Sättigung zu erkennen, die Kapazität liegt hierbei jeweils um 1, die K_d -Werte sind unter Berücksichtigung der Standardabweichung annähernd identisch. Bei pH 8,5 fallen die großen Standardabweichungen der Messwerte, bei pH 6,5 (A) die zu hohe Kapazität auf. Letztere sollte durch die Normierung eigentlich 1 betragen. Darüberhinaus ist bei pH 6,5 die Sättigung noch nicht erreicht.

4.5. Fluoreszenzspektroskopischer Nachweis der Häminkonzentration

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.

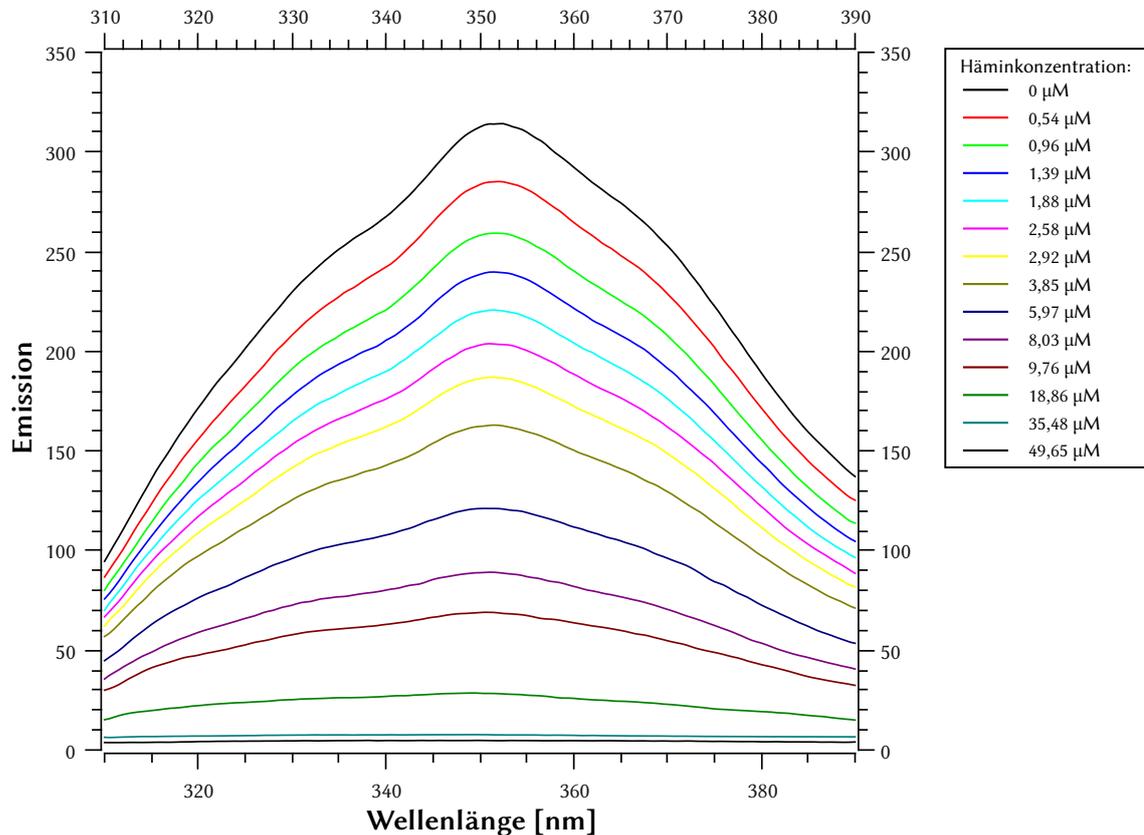


Abbildung 4.8.: Emissionsspektrum des Fluoreszenz-Assays nach Abzug des Pufferspektrums; Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Es ist ein deutlicher Quench bei zunehmender Häminkonzentration zu erkennen. Der Quench ist bei etwa 20 μM bis 40 μM Häm vollständig.

4. Ergebnisse

Die Analyse der Daten ergibt einen K_d -Wert von $4,9\ \mu\text{M}$. Hierfür wurde die relative Intensität des Fluoreszenzsignals bei $353\ \text{nm}$ im Vergleich zum Signal von RTE1 ohne Häminzugabe gegen die eingesetzte Häminkonzentration aufgetragen. Es wurde eine nichtlineare Regression durchgeführt (vgl. 4.4). Der K_d konnte dann Gleichung 4.1 entnommen werden.

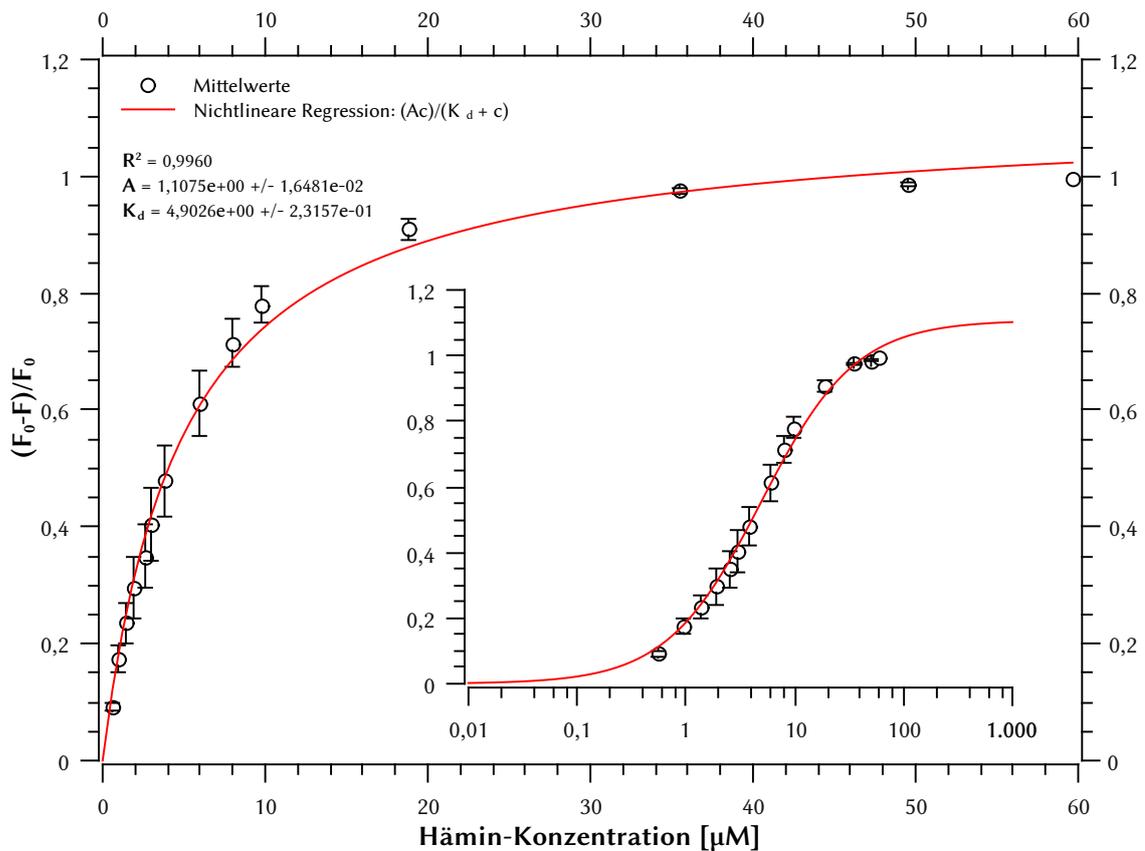


Abbildung 4.9.: Häminbindung im Fluoreszenz-Assay; Aufgetragen sind die relative Intensität des Fluoreszenzsignals gegen die Häminkonzentration. Letztere wurde aus einer Absorptionmessung mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten ermittelt. F_0 ist die Intensität des Fluoreszenzsignals von RTE1 bei einer Wellenlänge von $353\ \text{nm}$ ohne Häminzugabe, F die entsprechende Intensität bei Zugabe von Hämin. 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.

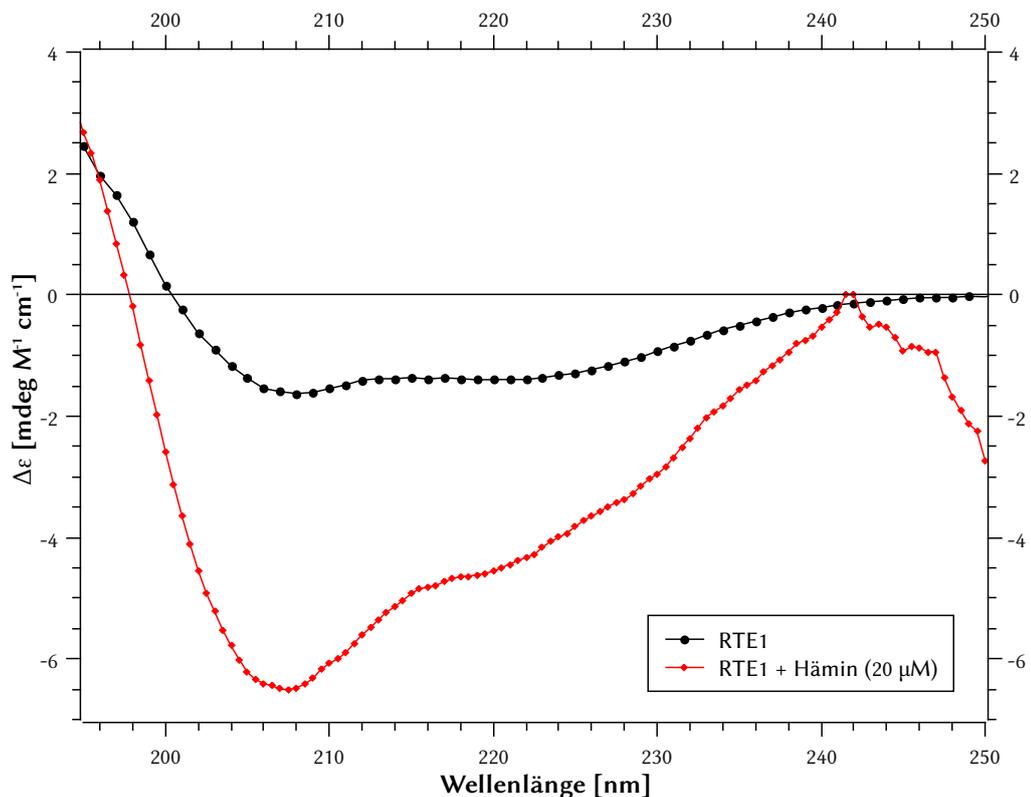


Abbildung 4.10.: CD-Spektren von gereinigtem RTE1; Die Daten stammen von unterschiedlichen Präparationen von RTE1. RTE1 wurde in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer mit 0,003 % (w/v) Fos-Cholin 16 gelöst. Die Proteinkonzentration betrug 0,05 mg mL⁻¹. Die Spektren wurden mit einer Auflösung von 0,5 nm (RTE1 + 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.

4. Ergebnisse

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*. Zusätzlich wurde die Sekundärstruktur von RTE1 ohne Häminzugabe aus der Aminosäuresequenz mit SOPMA berechnet (Geourjon u. Deléage, 1995). Hierbei wurden 27 % α -Helix, 23 % β -Faltblatt, 8 % β -Schleife und 42 % *Random Coil* vorhergesagt (Abbildung A.3). Eine Gegenüberstellung der Sekundärstrukturanteile findet sich in Tabelle 4.1.

Bei Zugabe von Hämin zeigt sich also ein höherer Anteil von α -Helices und ein geringerer Anteil β -Faltblättern.

Tabelle 4.1.: Sekundärstrukturanteile; Vergleich zwischen Vorhersage aus Aminosäuresequenz und CD-Daten

Bezeichnung	α -Helix [%]	β -Faltblatt [%]	β -Schleife [%]	<i>Random Coil</i> [%]
RTE1 (SOPMA)	27	23	8	42
RTE1	18	30	22	30
RTE1/Hämin	44	6	25	25

5. Diskussion

5.1. Nachweis und Quantifizierung der Häminbindung

Die Ergebnisse aller zum Bindungsnachweis eingesetzten Methoden lassen auf eine Häminbindung durch RTE1 schließen. Zunächst ist aus dem Häminagarose-Assay ersichtlich, dass eine stabile Bindung von RTE1 an immobilisiertes Hämin zu Stande kommt. Durch einfache Waschschriffe mit Puffer konnte RTE1 nicht mehr vom Säulenmaterial eluiert werden, erst unter denaturierenden Bedingungen oder Einsatz einer Häminlösung kam es zur Elution. Dies deutet auf eine relativ stabile Bindung von RTE1 an die Häminagarose hin.

Beim photometrischen Bindungsassay (siehe 4.4) zeigt sich das Zustandekommen einer Bindung in der Absorptionzunahme im Soretband, sowie der Verschiebung der Absorptionsmaxima. Vergleichbares wurde auch von Vincent u. Muller-Eberhard (1985), sowie Duncan et al. (1999) bei ihren Untersuchungen von Häm-bindenden Proteinen beobachtet, so dass das Auftreten von Absorptionzunahme im Soretband und Verschiebung der Maxima als Charakteristikum einer Häminbindung angesehen werden kann.

Die Fluoreszenzspektroskopie zeigte einen sehr deutlichen Quench bei Häminzugabe. Ähnliche Untersuchungen an einem anderen Häm-bindenden Protein wurden von Vincent u. Muller-Eberhard (1985) durchgeführt. Auch in diesem Fall kann davon ausgegangen werden, dass der Quench durch die Interaktion zwischen RTE1 und Hämin zu Stande kommt. Im Unterschied zu Vincent u. Muller-Eberhard (1985) konnte aber bei Anregung mit 278 nm kein Emissionspeak von Tyrosin bei

5. Diskussion

305 nm festgestellt werden. Stattdessen zeigte sich eine Tryptophanfluoreszenz mit einem Maximum bei 350 nm, welche letztlich auch für die Messung genutzt wurde.

Sehr deutlich ist die Änderung in der Sekundärstruktur von RTE1 bei Zugabe von Häm. Der α -helikale Anteil verdoppelt sich nahezu, während der Anteil an β -Faltblättern stark zurückgeht. Eine Änderung in der Sekundärstruktur bei der Zugabe eines Liganden kann als Hinweis auf eine Bindung gedeutet werden. Die Aussagekraft der Daten aus der CD-Spektroskopie wird allerdings dadurch gemindert, dass hierbei die Spektren aus zwei unterschiedlichen Präparationen von RTE1 miteinander verglichen wurden. Es ist dabei nicht auszuschließen, dass präparationsbedingte Unterschiede – beispielsweise durch Variationen in Reinheit und Konzentration von RTE1 oder der Konzentration verschiedener Ionen – die Messung direkt oder indirekt beeinflusst haben. Somit sollte diese Messreihe mit Proteinproben aus derselben Präparation wiederholt werden.

Die Quantifizierung der Häm.bindung ergab ausgehend von der photometrischen Messung einen K_d -Wert von bei $(7,24 \pm 2,23) \mu\text{M}$ bei pH 7,5. Ein ähnlicher K_d von $(8,40 \pm 1,04) \mu\text{M}$ wurde für pH 8,5 bestimmt. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung sind beide als nahezu identisch zu bewerten. Der K_d bei pH 6,5 lag um eine Größenordnung höher bei $(79,6 \pm 12,7) \mu\text{M}$. Bei der Interpretation dieser Daten ist zu beachten, dass bei pH 6,5 die Sättigung nicht annähernd erreicht wurde und somit die Regression relativ ungenau ist. Hierauf deutet vor allem die viel zu hohe Kapazität hin, während durch die Normierung ein Wert von eins zu erwarten wäre. Trotzdem zeigt sich, dass die Bindung von Häm. an RTE1 bei saurem pH deutlich schwächer ist, als bei physiologischem oder leicht alkalischem pH.

Die in der photometrischen Messung erhobenen Daten lassen sich durch die Fluoreszenzspektroskopie bestätigen. Hierbei ergab sich ein K_d von $(4,90 \pm 0,23) \mu\text{M}$ bei pH 7,5. Dieser Wert entspricht nahezu dem photometrisch bestimmten K_d -Wert in seinem unteren Grenzwert. Allgemein betrachtet besitzt die Fluoreszenzspektroskopie im Vergleich zur UV-Vis-Spektroskopie die höhere Aussagekraft, da die Fluoreszenzsignale mit höherer Sensitivität detektiert werden können, während bei der UV-Vis-Spektroskopie bei zunehmender Absorption Störeffekte auftreten.

5. Diskussion

Daher konnte auch bei höheren Häminkonzentrationen gemessen werden, als beim photometrischen Bindungsassay.

Des Weiteren muss auch hier beachtet werden, dass beim photometrischen Bindungsassay und der Fluoreszenzspektroskopie RTE1 aus unterschiedlichen Präparationen zum Einsatz kam. Auch hier kann nicht ausgeschlossen werden, dass präparationsbedingte Unterschiede die Ergebnisse beeinflusst haben. So wäre denkbar, dass verschiedene lösliche RTE1-Spezies mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften in variablen Konzentrationen vorlagen, oder aber unterschiedliche Ionenkonzentrationen – beispielsweise K^+ – die Affinität von RTE1 zu Häm in beeinflusst haben. Somit sollte auch hier zur Verifizierung eine gemeinsame Messreihe mit RTE1 aus derselben Präparation durchgeführt werden.

Andere Häm-bindende Proteine weisen K_d -Werte im mikromolaren bis oberen nanomolaren Bereich auf (Tabelle 5.1). Insofern scheinen die ermittelten K_d -Werte für RTE1 in einem für Häm-bindende Proteine realistischen Bereich zu liegen.

Tabelle 5.1.: K_d verschiedener Häm-bindender Proteine im Vergleich zu RTE1. Für RTE1 ist der K_d aus der Fluoreszenzspektroskopie bzw. in Klammern aus dem photometrischen Bindungsassay angegeben. Bei denen zum Vergleich herangezogenen Proteinen handelt es sich um *RETINOID-AND FATTY ACID-BINDING GLYCOPROTEIN* (RFABG), *HEME-BINDING PROTEIN* (HBP) und *HEME-BINDING PROTEIN A* (HasAp)

Protein	K_d [μM]	Literatur
RFABG	0,38	Duncan et al. (1999)
HBP	0,43	Vincent u. Muller-Eberhard (1985)
HasAp	35	Yukl et al. (2010)
RTE1	$4,90 \pm 0,23$ ($7,24 \pm 2,23$)	

5.2. Spezifität der Häminbindung

Dass es sich bei der im Häminagarose-Assay beobachteten Bindung von RTE1 an das Säulenmaterial (vgl. 4.3) um eine spezifische Bindung handelt, kann als gesichert betrachtet werden, da eine Elution nicht nur unter denaturierenden Bedingungen – mit SDS-Probenpuffer und Erhitzen – sondern auch durch Waschen mit einer Häminlösung erfolgt. Unspezifisch an die Trägermatrix gebundenes Protein ließe sich hierdurch nicht eluieren. Bei einer spezifischen Bindung an das an der Matrix immobilisierte Hämin kann dieses als Bindungspartner durch das freie Hämin in der Lösung verdrängt werden, wodurch das Protein eluiert.

Tsutsui u. Mueller (1982) beschreiben eine Möglichkeit das immobilisierte Hämin durch Natronlauge weitestgehend von der Agarosematrix zu lösen. Die damit erhaltenen Agarosebeads ohne gebundenes Hämin könnten dann zur Quantifizierung einer möglichen unspezifischen Bindung an die Matrix dienen. Hierdurch ließe sich in zukünftigen Versuchen der Anteil des spezifisch bindenden Proteins bestimmen.

5.3. Ausblick

Es könnten Bindungsassays für die Häminbindung von RTE1 etabliert werden, welche rein qualitativ (Häminagarose) oder auch quantitativ (UV-Vis-Spektroskopie, Fluoreszenzspektroskopie) eingesetzt werden können. Sollte die Häminbindung ein Charakteristikum eines funktionell gefalteten RTE1 sein, so ließe sich mit Hilfe dieser Assays überprüfen, ob ein denaturierend gereinigtes RTE1 wieder erfolgreich renaturiert werden kann. Wie in Kapitel 4.2 beschrieben, ergeben sich aus der denaturierenden Reinigung durch die Solubilisierung von *Inclusion Bodies* weitaus höhere Proteinausbeuten. Sollte die Rückfaltung gelingen, ließe sich genügend Protein für Kristallisationsansätze gewinnen, welche letztlich eine Vorbereitung zur Strukturaufklärung mittels Röntgenkristallographie wären.

Darüberhinaus zeigt sich, dass die Häminbindung nicht ein Alleinstellungsmerkmal des humanen RTE1-Homologs ist, sondern auch in *A. thaliana* und möglicher-

weise auch anderen pflanzlichen und tierischen RTE1-Homologen zu finden ist. Damit stellt sich die Frage nach der Funktion dieser Bindung, oder ob diese in Pflanzen ohne funktionellen Hintergrund zufällig entstand und erst in tierischen Organismen ohne Ethylensignalweg eine biologisch signifikante Funktion erhielt. Möglicherweise liegt hier auch die Erklärung weshalb RTE1-Homologe konserviert in einer Vielzahl von Eukaryoten mit Ausnahme der Pile zu finden sind, von denen – abgesehen von den Pflanzen – keine einen bekannten Ethylensignalweg aufweisen.

Weitere Versuche könnten außerdem zum Einfluss des Redoxstatus auf die Bindungseigenschaften durchgeführt werden. Hierfür könnten Disulfidbrücken in RTE1 zunächst mit DTT reduziert und die Cysteine mit N-Ethylmaleinimid (NEM) als Schutzgruppe modifiziert werden. DTT würde entfernt, um nicht mit dem zugesetzten oder an die Häm-inagarose gebundenen Häm-in zu reagieren. Der weitere Verlauf entspräche dann den hier beschriebenen Bindungsassays. In diesem Zusammenhang wäre zunächst auch die Kenntnis über den Anteil an freien Sulfhydrylgruppen im Protein von Interesse, welche nach Ellmann (Riener et al., 2002) bestimmt werden kann.

Zur Optimierung des photometrischen Bindungsassays könnte ein *NanoDrop*-Spektralphotometer zum Einsatz kommen. Da hier bei einem Probenvolumen von etwa 1 µL eine Schichtdicke von 1 mm erreicht wird, können Proben bis zu einer Absorption von 300 vermessen werden. Somit könnten auch höhere Häminkonzentrationen eingesetzt werden, wie sie beispielsweise nötig wären, um bei pH 6,5 eine Sättigung zu erreichen. Gleichzeitig würde nur ein Bruchteil der bisher benötigten Proteinmenge verbraucht.

Abbildungsverzeichnis

2.1.	Ethylensynthese und Yang-Zyklus	8
2.2.	Ethylen-Signalweg	10
2.3.	Modell des Signalzustandes von ETR1	13
3.1.	Vektorkarte von pET-15b-RTE1	24
3.2.	Struktur des Hämins	31
4.1.	SDS-PAGE der native Reinigung von RTE1	38
4.2.	Westernblot der nativen Reinigung von RTE1	38
4.3.	SDS-PAGE der denaturierenden Reinigung von RTE1	39
4.4.	SDS-PAGE eines Häminagarose-Assays	40
4.5.	Spezifität der Hämin-Bindung	41
4.6.	Differenzspektren des photometrischen Bindungsassays	43
4.7.	Relative Verschiebung der Absorptionsmaxima	44
4.8.	Emissionsspektrum des Fluoreszenz-Assays	45
4.9.	Häminbindung im Fluoreszenz-Assay	46
4.10.	CD-Spektren von gereinigtem RTE1	47
A.1.	Nukleotidsequenz von RTE1	62
A.2.	Aminosäuresequenz von RTE1	63
A.3.	Strukturvorhersage von RTE1 mit SOPMA	64

Tabellenverzeichnis

3.3.	Pipettierschema für SDS-Gele	28
3.4.	Silberfärbung von Polyacrylamidgelen	28
3.5.	Pipettierschema für BCA-Kalibriergerade	30
3.6.	Pipettierschema für BCA-Proben	30
3.7.	Häminkonzentration für die UV-Vis-Spektroskopie	33
3.8.	Häminkonzentration für die Fluoreszenzspektroskopie	35
4.1.	Sekundärstrukturanteile	48
5.1.	K_d verschiedener Häm-bindender Proteine im Vergleich zu RTE1	51

Literaturverzeichnis

- [Chang 2009] CHANG, C.: *The 8th International Symposium on the Plant Hormone Ethylene*. 2009
- [Dong et al. 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 et al. 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 proapolipophorin 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
- [Geourjon u. Deléage 1995] GEOURJON, C ; DELÉAGE, G: SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. In: *Computer Applications in the Biosciences: CABIOS* 11 (1995), Dezember, Nr. 6, 681–684. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8808585>. – ISSN 0266–7061. – PMID: 8808585
- [Greenfield 2007] GREENFIELD, Norma J.: Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. In: *Nature Protocols* 1 (2007), Nr. 6, 2876–2890. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.202>. – DOI 10.1038/nprot.2006.202. – ISSN 1754–2189

- [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
- [Laemmler 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
- [Lakowicz 2006] LAKOWICZ, Joseph R. (Hrsg.): *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Boston, MA : Springer US, 2006 <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-0-387-46312-4>. – ISBN 978–0–387–31278–1
- [Malach 2009] MALACH, Anuschka: *Expression und Reinigung des putativen Membranproteins RTE1 aus Arabidopsis thaliana*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Diplomarbeit, 2009
- [Provencher u. Gloeckner 1981] PROVENCHER, Stephen W. ; GLOECKNER, Juergen: 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 et al. 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 et al. 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
- [Riener et al. 2002] RIENER, Christian ; KADA, Gerald ; GRUBER, Hermann: Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with

- 4,4'-dithiodipyridine. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 373 (2002), Nr. 4-5, 266–276. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-002-1347-2>. – DOI 10.1007/s00216-002-1347-2. – ISSN 1618–2642
- [Smith et al. 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

[Yukl et al. 2010] YUKL, Erik T. ; JEPKORIR, Grace ; ALONTAGA, Aileen Y. ; PAUTSCH, Lawrence ; RODRIGUEZ, Juan C. ; RIVERA, Mario ; MOENNE-LOCCOZ, Pierre: Kinetic and Spectroscopic Studies of Hemin Acquisition in the Hemophore HasAp from *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Biochemistry* 49 (2010), Nr. 31, 6646–6654. <http://dx.doi.org/10.1021/bi100692f>. – DOI 10.1021/bi100692f. – ISSN 0006–2960

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	Circulardichroismus
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
<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>
HasAp	<i>HEME-BINDING PROTEIN A</i>

Abkürzungsverzeichnis

HBP	<i>HEME-BINDING PROTEIN</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>
NEM	N-Ethylmaleinimid
p. a.	<i>pro analysi</i> (lat.), für die Analyse
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RFABG	<i>RETINOID- AND FATTY ACID-BINDING GLYCOPROTEIN</i>
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
SOPMA	<i>self-optimized prediction method</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

A. Ergänzendes Material

A.1. Nukleotid- und Aminosäuresequenzen

```
atgtcacgtg gaagaggagt tcctatgatg gacctgaaac gaagttatga
tgttgaagac aggggtggtgt ccgtgtctat accatcaata atcgaagctg
atgaggctga tctgtggcca ctacctgaga ttgataccaa gaagtcgaaa
tttccttgct gtatagtttg gactcctctt cctgttgtct cttggttggc
tcctttcatt ggtcatattg gactttgcag agaagatgga gtcattttgg
actttgctgg atctaacttc atcaatgttg atgattttgc atttggtcct
cctgctcgct atctccaact cgatagaacc aagtgttgct taccaccaa
tatgggtgga catacttgca agtatggatt caaacacacc gactttggaa
cagcgcgtac atgggataat gcactgagct cgagcacacg tagctttgag
cataaaacct acaacatctt cacttgtaac tgccattcgt ttgttgcaaa
ctgtttgaac cgtctttgct atggtggctc aatggagtgg aatatggtga
atgttgctat tttacttatg atcaaaggga aatggatcaa tggttcatca
gtagtccgct cgtttctgcc atgtgctgtg gtcacgtctt tgggggtggt
gcttgtcggc tggccattcc tcatcggtct ctcttcgttc tcgctactac
tctttgcctg gttcataatt gctacttact gttttaagaa cataattact
ggatccggct gctaa
```

Abbildung A.1.: Nukleotidsequenz von RTE1 (765 bp)

A. Ergänzendes Material

MSRGRGVPM DLKRSYDVED RVVSVSIPSI IEADEADLWP LPEIDTKKSK
FPCCIVWTPL PVVSWLAPFI GHIGLCREDG VILDFAGSNF INVDDFAFGP
PARYLQLDRT KCCLPPNMGG HTCKYGFKHT DFGTARTWDN ALSSSTRSFE
HKTYNIFTCN CHSFVANCLN RLCYGGSM EW NMVNVAILLM IKGKWINGSS
VVRSFLPCAV VTSLGVVLVG WPFLIGLSSF SLLFAWFII ATYCFKNIIT
GSGC

Abbildung A.2.: Aminosäuresequenz von RTE1

A.2. Strukturvorhersage

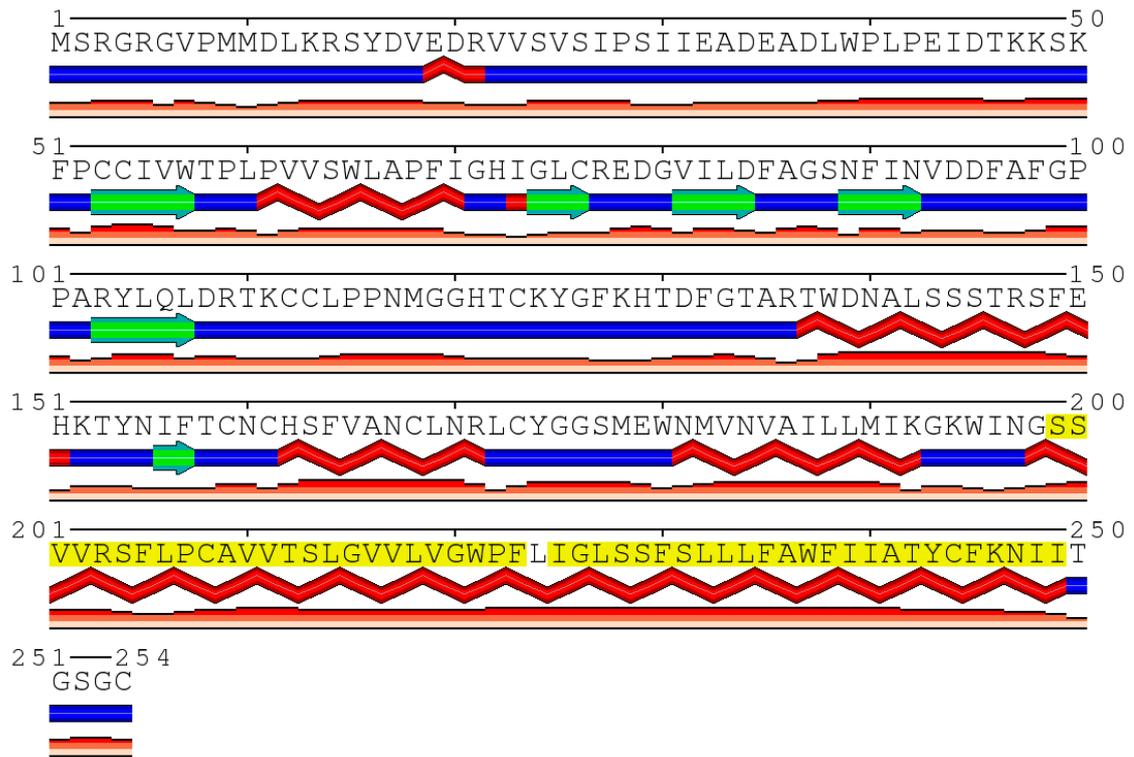


Abbildung A.3.: Strukturvorhersage von RTE1 mit SOPMA; In der ersten Zeile befindet sich die Aminosäuresequenz, in der zweiten Zeile die Sekundärstruktur: Pfeile kennzeichnen β -Faltblätter, gezackte Linien α -Helices und blaue Abschnitte *Random Coils*. Die dritte Zeile gibt die Vorhersagegenauigkeit wieder (größer ist besser). Gelb hinterlegt sind membrandurchspannende Helices.

B. Danksagung

Ich bedanke mich zu aller erst bei Herrn Prof. Dr. Georg Groth für das interessante und herausfordernde Thema dieser Arbeit, die freundliche Aufnahme in der Arbeitsgruppe und die Denkanstöße.

Darüberhinaus gilt mein Dank der gesamten Arbeitsgruppe für jegliche Unterstützung und den freundlichen Umgang, besonders David und Mareike für die vielen aufmunternden und lustigen Gespräche im Labor.

Insbesondere danke ich Ellie, die schon im F-Praktikum meine – manchmal wahrscheinlich banalen – Fragen immer mit einer unglaublichen Geduld und Präzision beantwortet hat und eines der gezeigten CD-Spektren für mich aufgenommen hat. Entsprechend danke ich auch Mel, die das andere Spektrum – unter tragischem Verlust der Küvette – gemessen hat. Benni danke ich für das „Um eine Ecke mehr als ich“-Denken.

Ohne Anuschka hätte es das Thema zumindest in dieser Form für mich nicht gegeben, ebensowenig wie das Expressions- und Reinigungsprotokoll. Danke!

C. Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit selbstständig verfasst und keine anderen, als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle Stellen, die ich aus den Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommen habe, sind als solche kenntlich gemacht.

Alexander Ralph Michael Minges

Düsseldorf, 28. September 2010