



Untersuchung der Protein-Protein-Interaktion von MAP-Tau und 14-3-3 Proteinen und Beeinflussung der Interaktion durch *small molecules*

Bachelorarbeit im Studiengang Chemische Biologie



Franziska Leidreiter

Dortmund, August 2012

Erstgutachter: Dr. Christian Ottmann Zweitgutachter: Prof. Dr. Daniel Rauh

Inhaltsverzeichnis

1	Einleit	ung	1
	1.1 14	-3-3 Proteine	1
	1.1.1	Struktur der 14-3-3 Proteine	1
	1.1.2	Funktion der 14-3-3 Proteine	2
	1.2 Ta	u-Protein	4
	1.2.1	Funktion von Tau und Wechselwirkung mit 14-3-3 Proteinen	5
	1.2.2	Medizinische Relevanz von Tau	5
2	Zielset	zung	7
3	Materi	alien	9
	3.1 Me	dien	9
	3.2 Pu	ffer	10
	3.2.1	Protein-Aufreinigung	10
	3.2.2	Gelelektrophorese/Western Blot	11
	3.2.3	Fluoreszenz-Polarisationsassay	11
	3.2.4	Oberflächenassay	12
	3.2.5	Kristallisation	12
	3.3 Ba	kterienstämme	12
	3.4 Pri	mer	13
	3.4.1	Primer für die ortsspezifische Mutagenese	13
	3.4.2	Sequenzierprimer für den pTyb12 Vektor	13
	3.5 Pla	smide	13
	3.6 Pe	otide / Proteine	14
	3.7 Ge	räteliste	15
4	Metho	den	16
	4.1 Mc	lekularbiologische Methoden	16
	4.1.1	Ortsgerichtete Mutagenese	16
	4.1.2	Transformation / Plasmidpräparation	17
	4.1.3	Sequenzier-PCR	18

	4.1.4	DNA-Fällung	19
	4.1.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	19
	4.2 Mi	krobiologische und proteinbiochemische Methoden	20
	4.2.1	Proteinexpression	20
	4.2.2	Zellaufschluss	20
	4.2.3	Affinitätschromatographie	21
	4.2.4	Gelfiltrationschromatographie	23
	4.2.5	Dialyse	24
	4.2.6	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	24
	4.2.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	25
	4.2.8	Western Blot	26
	4.3 Bio	pphysikalische Methoden	27
	4.3.1	Fluoreszenz-Polarisation	27
	4.3.2	Oberflächenbasierter Fluoreszenzassay	29
	4.3.3	Proteinkristallisation	30
5	Ergebr	nisse und Diskussion	33
	5.1 Pr	oteinaufreinigung	33
	5.1.1	Expression und Aufreinigung von 14-3-3η	33
	5.1.2	Expression und Aufreinigung von GST	35
	5.1.3	Aufreinigung von Tau	36
	5.1.4	Western-Blot	40
	5.2 We	echselwirkung Tau mit 14-3-3 Proteinen	43
	5.2.1	Isoformspezifität	43
	5.2.2	Stabilisierung	48
	5.2.3	Inhibierung	50
	5.3 Un	tersuchung des Bindungsverhalten von Tau an 14-3-3 Proteine	52
	5.3.1	Ortsgerichtete Mutagenese	52
	5.3.2	Oberflächenassay	54
	5.4 Kr	istallisation	56
6	Zusam	menfassung und Ausblick	59
7	Literat	ur	62

8	Dar	nksagung	65
0	۸nk	apa a second	66
7	AIII	iany	00
(9.1	Messdaten	66
(9.2	Vektorkarten	67
(9.3	Kristallographische Daten	70
(9.4	Tabellenverzeichnis	72
(9.5	Abbildungsverzeichnis	73

Abkürzungsverzeichnis

А	Amper
Å	Angström
Arg	Arginin
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
CBD	Chitin-Binde-Domäne
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
et al.	und andere
FC-A	Fusicoccin A
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
KD	Bindungskonstante
kDa	Kilodalton
LB	lysogenybroth
Lys	Lysin
Μ	molar [Mol/Liter]
MAP	Mikrotubuli-Assoziiertes-Protein
MBD	Mikrotubuli-Bindene-Domäne
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mМ	millimolar
mRNA	boten Ribonukleinsäure (messenger Ribonucleic acid)
NFT	neurofibrilläre Bündel (neurofibrillary tangles)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase-Chain-reaction)

PHF	Helikal gepaarte Filamente (helical paired filaments)
pS	Phosphoserin
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
ssDNA	einzelsträngige DNA
SV	Säulenvolumen
ТВ	terrificbroth
TEV	Tobacco Etch Virus
Tyr	Tyrosin
μl	mikroliter
μΜ	mikromolar

Chemikalienliste

BME	beta-Mercaptoethanol
CaCl ₂	Calciumchlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
FAM	Fluoreszin
GSH	Glutathion
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IPTG	IsopropyI-β-D-thiogalactopyranosid
MgCI ₂	Magnesiumchlorid
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
PMSF	Phenylmethysulfonylfluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
TCEP	Tris(2-Carboxyethyl)phosphin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

1 Einleitung

1.1 14-3-3 Proteine

Die 14-3-3 Proteine gehören zu einer ubiquitären Klasse von hoch konservierten Regulatorproteinen, welche um 28-33 kDa groß sind (Hermeking, 2003, Mackintosh, 2004). In den 60er Jahren wurden diese von Perez und Moore identifiziert und benannt (Moore *et al.*, 1968). Die Nomenklatur erfolgte anhand des Elutions- und Migrationsverhaltens der Proteine. Bei einer Diethylaminoethyl (DEAE)-Cellulose-Chromatographie befand sich das Protein in der 14. Fraktion und wanderte bei einer zwei dimensionalen Stärke-Gelelektrophorese zu der Position 3.3 (Aitken, 2006).

Die aciden Proteine kommen in allen eukaryotischen Zellen vor. Dabei variiert die Anzahl der Isoformen in verschiedenen Organismen. In Pflanzen wurden bis zu 15 Isoformen identifiziert (Gardino *et al.*, 2006). Im menschlichen Organismus konnten bislang sieben Isoformen identifiziert werden. Die Benennung erfolgt nach dem griechischen Alphabet; α , β , γ , ζ , η , δ , σ und τ . Wobei α und δ Phosphoformen der Isoform β bzw. ζ sind. Zudem werden die Isoformen τ und σ nur in T- und Epithelzellen exprimiert, wohingegen im Gehirn der Säugetiere die Isoformen ε , β , γ und ζ hoch exprimiert vorliegen (Hashiguchi, Sobue, & Paudel, 2000).

1.1.1 Struktur der 14-3-3 Proteine

In den 90er Jahren wurden Kristallstrukturen der humanen 14-3-3 τ (Xiao *et al.*, 1995) und ζ Isoform (Liu *et al.*, 1995) analysiert. Ein Monomer besteht aus neun antiparallelen α -Helices (A-I) mit organisiertem N- und C-Terminus, welche sich U-förmig anlagern. Da 14-3-3 Proteine meist als Dimere vorliegen, ergibt sich die typische W-Form der Proteine mit einer amphipatischen Bindetasche pro Monomer (Aitken, 2006). Die Bindetasche bzw. der Kanal umfasst in etwa 35 x 35 x 30 Å. Für die Dimerisierung sind die ersten vier N-terminalen Helices verantwortlich. Senkrecht zu diesen sind die fünf Cterminalen Helices, welche die Seitenwände und das Dach des Kanals bilden (Hermeking, 2003). Dabei interagieren die Helices A und B eines Monomers mit den Helices C und D des Anderen. Zur Stabilisierung des Komplexes werden zusätzlich Salzbrücken zwischen den Helices ausgebaut. Die Anzahl der Salzbrücken unterscheidet sich je nach Isoform. Die Isoform ε beispielsweise formt bevorzugt Heterodimere, da es als Homodimer nur eine Salzbrücke ausbilden kann. Dagegen homodimerisiert die σ -Isoform, da es in dieser Form eine zusätzliche alternative Salzbrücke aufweist (Gardino *et al.*, 2006). Die endständige α -Helix I ist eine hoch acide Helix, welche die höchste Divergenz zwischen den Isoformen aufweist. Desweiteren unterscheiden sich die Isoformen kaum in der hoch konservierten Aminosäuresequenz der Bindegrube. Der Bereich der äußeren Oberfläche zeigt jedoch deutliche Unterschiede zwischen den Isoformen auf. Demnach lässt sich vermuten, dass diese Region die Isoformspezifität ausmacht (Finnie *et al.*, 1999)



Abbildung 1: 14-3-3 σ Dimer (Monomer A hellblau, Monomer B, grün) mit p53pT387 Peptid (gelbe Stabform und Regenbogenband) (Schumacher, Mondry, Thiel, Weyand, & Ottmann, 2010).

1.1.2 Funktion der 14-3-3 Proteine

Die 14-3-3 Proteine weisen eine Vielzahl von Funktionen auf. Sie regulieren und koordinieren essentielle zelluläre Prozesse wie DNA-Reparatur, Apoptose, Signaltransduktion, Metabolismus und transkriptionale Regulation von Genexpression (Morrison, 2009). Dementsprechend besitzen sie weit über 200 Interaktionspartner (Aitken, 2006).

Die 14-3-3 Proteine weisen selber keine enzymatischen Aktivitäten auf, können aber durch Interaktion mit Enzymen deren Aktivität erhöhen oder schwächen. In Verbindung mit Cdc25 Phosphatasen wirken 14-3-3 Proteine als Inhibitoren (Morrison, 2009) und bewirken dadurch den Eintritt in den Zellzyklus (Peng, 1997), während sie das Tumorsuppressor-Protein p53 stabilisieren (Rose *et al.*, 2010). Eine weitere Funktion der 14-3-3 Proteine ist die des Adapter-Proteins (Vincenz & Dixit, 1996). Da 14-3-3

Proteine als Dimere vorliegen, kann je ein Makromolekül in einer der zwei Bindetaschen koordiniert werden und somit die Bindung zweier Proteine erreicht werden. Demnach können 14-3-3 Proteine die Wechselwirkung von zwei Proteinen vermitteln oder verstärken. Im Falle der RAF1 Proteine, verbrückt 14-3-3 diese mit den Proteinen BCR, PKC-ζ oder A20 (Hermeking, 2003). Durch die Interaktion mit ihren Partnern können die 14-3-3 Proteine die Lokalisation dieser beeinflussen.

In diesem Zusammenhang wurden zwei unterschiedliche Bindungsmuster der 14-3-3 Proteine entdeckt: RSXpSXP (Motiv mode I) und RXY/FXpSXP (Motiv mode II) (Yaffe *et al.*, 1997). Das X bezieht sich auf eine beliebige Aminosäure. Diese beiden Bindungsmotive charakterisieren 14-3-3 Proteine als Phosphoserin-bindende Proteine (Muslin *et al.*, 1996). Erst 2004 wurde ein drittes Bindungsmotiv durch Ganguly und Kollegen identifiziert. Diese Motiv ist C-terminal und wird als Motiv mode III bezeichnet: pS/pT(X₁₋₂) (Ganguly *et al.*, 2005, Ottmann *et al.*, 2007).



Abbildung 2: Darstellung der drei verschiedenen Bindemotive von 14-3-3 mit einem Peptid. A) Mode I Bindemotiv. Das 14-3-3 Protein ist als Oberflächendarstellung in braun dargestellt, das Peptid in Stäbchenform (grün) und der Phosphatrest in orange. B) Mode II Bindemotiv. Farbgebung wie in A), das Peptid ist in Iila dargestellt. C) Mode III Bindemotiv. Farbgebung wie in A), das Peptid ist in türkis dargestellt. D) Überlagerung der drei Bindemotive in Liniendarstellung. Farbgebung wie in A), B) und C).

(Schumacher, B.S. "Strukturelle und molekulare Charakterisierung von 14-3-3 Protein / Zielprotein Wechselwirkungen Implikationen für therapeutische Intervention", Dissertation, Ruhr-Universität Bochum. (2010))

Alle Motive weisen ein Phosphoserin oder Phosphothreonin auf, über welche der Ligand in der amphipatischen Bindegrube der 14-3-3-Monomere koordiniert wird. Die Koordination erfolgt durch die Aminosäuren Lys-49, Arg-56, Arg-127 und Tyr-128, welche sich in der 3. und 5. α -Helix befinden (Hermeking, 2003). Des Weiteren sind Bindungsverhalten bekannt, welche phosphorylierungsunabhängig sind. Als Beispiel dienen Raf-Kinasen, welche über eine Cystein-reiche Region an 14-3-3 binden (Aitken, 2006) und die BH3-Domäne-Proteinen/BAX, welche direkt mit 14-3-3 Proteine interagieren und die Apoptose regulieren (Morrison, 2009).

1.2 Interaktionspartner Tau

Tau gehört zu der Familie der Mikrotubuli-assoziierten-Proteine (MAP). Es umfasst je nach Isoform 50-64 kDa (Lee *et al.*, 1988). Es gibt sechs Isoformen im Gehirn eines Erwachsenen, die zwischen 352 und 441 Aminosäuren lang sind. Sie unterschieden sich in der Anzahl von Aminosäure-Repeats, welche 31-32 Aminosäuren lang sind und sich in der Mikrotubuli-Bindende-Domäne (MBD) am C-Terminus befinden. Die Anzahl der Repeats liegt bei drei bis vier (Robert & Mathuranath, 2007). Desweiteren unterscheiden sich die Isoformen durch die Anwesenheit von keinem, einem oder zwei Inserts am N-Terminus von Tau. Die vierte Aminosäure-Sequenz wird durch das Exon 10 codiert, während die N-terminalen Inserts von Exon 2 und 3 codiert werden. Beim alternativen Splicen der mRNA entstehen demnach die Isoformen (F Hernandez & Avila, 2007).



Abbildung 3: Die sechs verschiedenen Tau-Isoformen mit den Exons 2 (grün), 3 (blau) und 10 (gestreift) sowie die MBD (F Hernandez & Avila, 2007).

Insgesamt besitzt Tau drei funktionale Domänen, den N-Terminus, Mikrotubuli-Bindende-Domäne (MBD) und den C-Terminus. (Hashiguchi *et al.*, 2000). Zusätzlich flankieren zwei Prolin-reiche Regionen die MBDs. Phosphorylierung dieser Aminosäuren durch Protein Kinasen beeinflusst die Fähigkeit von Tau an Mikrotubuli zu binden (F Hernandez & Avila, 2007).

1.2.1 Funktion von Tau und Wechselwirkung mit 14-3-3 Proteinen

Tau ist ein cytosolisches Protein und wird hauptsächlich im Axon exprimiert. Das Protein reguliert die Assemblierung und Stabilisierung der Mikrotubuli (Alonso *et al.*, 2001) und ist ein wichtiger Faktor im axonalen Transport und in der Neurogenese.

Die 14-3-3 Proteinen Anwesenheit von führt zu einer verstärkten Multiphosphorylierung von Tau durch Protein Kinasen. Diese Modifizierung kann unter Anderem durch Protein Kinase A und B (PKA, PKB), Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK-3) und die Cyclin-abhängigen Kinasen Cdk2 und Cdk5 erfolgen (Sadik et al., 2009). Demnach wird durch Interaktion mit 14-3-3 Proteinen Tau ein besseres Substrat der Kinasen oder 14-3-3 Proteine stimulieren die Kinase-Aktivität. Verschiedene Experimente von Tau mit 14-3-3 ζ zeigten, dass 14-3-3 ζ ein Tau-Modulator ist (Hashiguchi et al., 2000). Hierbei gibt es phosphorylierungsabhängige- und unabhängige Bindungsmechanismen. Zunächst wurde. die Interaktion der MBD von Tau mit 14-3-3 als phosphorylierungsunabhängig beschrieben (Hashiguchi et al., 2000). Durch Sadik und Kollegen konnte jedoch verdeutlicht werden, dass Tau eine weitere Bindungsstelle für 14-3-3 Proteine besitzt. Die Interaktion an dieser Bindungsstelle wird durch Phosphorylierung verstärkt (Sadik et al., 2009).

1.2.2 Medizinische Relevanz von Tau

Durch Hyperphosphorylierung verliert Tau seine Mikrotubuli betreffende Funktion, wodurch diese instabil werden. Hyperphosphoryliertes Tau enthält 5-9 mol Phosphat/mol, während normal phospholyliertes Tau nur 2-3 mol Phosphat/mol aufweist (Hashiguchi *et al.*, 2000). Die multiphosphorylierten Tau Proteine lösen sich von der Mikrotubuli-Oberfläche, akkumulieren und lagern sich zu gepaarten helikalen Filamenten (*helical paired filaments* PHFs) an (Drewes, 2004). PHF-Tau ist eine wichtige

Komponente in neurofibrillären Bündeln (*neurofibrillary tangles*, NFT), welche vermehrt im Gehirn von Patienten mit Alzheimer zu finden sind (Hashiguchi *et al.*, 2000). Die Tendenz fibrilläre Polymere zu formen, wird durch Wechselwirkung von Tau mit 14-3-3 Proteinen verstärkt (Felix Hernandez, Cuadros, Avila, & Hernandez, 2004).

Neurodegenerative Krankheiten wie beispielsweise Alzheimer werden im Zusammenhang mit dem Protein Tau als Tauopathie bezeichnet.

Tabelle 1: Tauopathie im Zusammenhang mit hyperphosphoryliertem Tau (Hernandez &Avila, 2007)

Alzheimer Krankheit Progressive Supranukleäre Blickparese Corticobasale Degeneration Down-Syndrome Pick's Krankheit (frontotemporale Demenz) Guam-Parkinson-Demenz-Komplex Demenz mit *Argyrophilic Grains* Niemann-Pick Krankheit Typ C

In verschiedenen Arten der Tauopathie treten unterschiedliche Tau-Isoformen auf. Es wurde jedoch gezeigt, dass die Alzheimer-Krankheit unabhängig von Tau Isoformen ist (Lee *et al.*, 1988).

2 Zielsetzung

Wie in 1.2.2 beschrieben, besitzt Tau eine bedeutende Rolle bei neurodegenerativen Krankheiten, und in diesem Zusammenhang auch die 14-3-3 Proteine. Demnach ist es von therapeutischer Relevanz, den Tau-14-3-3-Komplex und die Einflüsse kleiner Moleküle auf die Wechselwirkung des Protein-Peptid-Komplexes zu untersuchen.

In diese Arbeit wird das Bindungsverhalten hinsichtlich der Phosphorylierungsabhängigkeit von Tau an 14-3-3 analysiert. Tau besitzt eine Domäne welche phosphorylierungsabhängig ist. In diesem Bereich liegen die Aminosäuren Ser214 und Ser324, welche als die bedeutsamsten Interaktionsstellen mit 14-3-3 Proteinen identifiziert wurden (Sadik *et al.*, 2009). Dieser Aspekt wird in der folgenden Arbeit behandelt, da zuvor durch Experimente mit 14-3-3 gezeigt wurde, dass diese Proteine phosphorylierungsunabhängig an Tau binden (Hashiguchi *et al.*, 2000). Mit der Tau-Proteindomäne im Aminosäurenbereich 207-328 werden die Versuche durchgeführt. Es müssen demnach zuerst Tau-Mutanten erzeugt und aufgereinigt werden. Durch die Punktmutation sollen die signifikanten Aminosäuren der phosphorylierungsabhängigen Bindestellen Ser214 und Ser324 durch die Aminosäuren Alanin oder Aspartat ersetzt werden. Anschließend kann mit Hilfe von Bindungsassays untersucht werden, inwieweit sich das Bindeverhalten von 14-3-3 mit Tau₂₀₇₋₃₂₈pS214,pS324 und den Tau-Phosphomimikry unterscheidet.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es, die Beeinflussung der Wechselwirkung zwischen 14-3-3 und Tau₂₀₇₋₃₂₈pS214,pS324 durch niedermolekulare Wirkstoffe, welche als Inhibitoren oder Stabilisatoren wirken, zu testen. Als Stabilisatoren werden Fusicoccin A (FC-A) und Derivate dieses Naturstoffes eingesetzt. Fusicoccin ist ein glukosidisches Diterpen und ein Metabolit des Pilzes *Phomopsis amygdali*, welcher ein Welken von Pflanzen bewirkt (Ballio *et al.*, 1964). Fusicoccin ist ein Stabilisator hinsichtlich der 14-3-3-Wechselwirkung mit der Protonenpumpe H+-ATPase (Ottmann *et al.*, 2007a).



Abbildung 4: Vergleich der Strukturen Fusicoccin A (FC-A), 16-*O*-Me-FC-H und ISIR-005 Die Derivate des Wirkstoffes 16-*O*-Me-FCH und ISIR-005 unterscheiden sich hinsichtlich de Seitenketten von FC-A.

Die Inhibierung des 14-3-3-Tau₂₀₇₋₃₂₈pS214,pS324-Komplexes wird in dieser Arbeit ebenfalls untersucht. Da die Bildung von PHF-Tau durch 14-3-3 verstärkt wird, ist dieser Aspekt von wesentlicher therapeutischer Relevanz. Die Inhibitoren welche eingesetzt werden, stammen aus einer Arbeit welche noch nicht veröffentlicht wurde. Demzufolge wird nicht weiter auf die Struktur und Herkunft dieser Wirkstoffe eingegangen.

Um die oben genannten Bindungsassays der Stabilisator- bzw. Inhibitormoleküle durchzuführen, eignet es sich vorher eine 14-3-3 Isoformspezifitätsmessung mit Tau₂₀₇₋₃₂₈pS214,pS324 durchzuführen. Es werden alle sieben humanen 14-3-3-Isoformen hinsichtlich ihrer Bindungsstärke getestet. Zusätzlich erfolgt eine Messung der einzelphosphorylierten Tau Peptide Tau₂₁₀₋₂₁₈pS214 und Tau₃₂₀₋₃₂₈pS324, um zu testen, ob beide Bindungsstellen gleich stark bei der Ausbildung der Wechselwirkung mit 14-3-3 Proteinen beteiligt sind.

Letztendlich werden Kristallkomplexe angesetzt um die Details der Bindung auf atomarer Ebene identifizieren zu können.

3 Materialien

3.1 Medien

Alle Nährmedien wurden bei 121 °C autoklaviert. Die Ansätze wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt und die Angaben beziehen sich auf 1 L Medium.

	LB-Medium	TB-Medium	LB-Agar	SOC-Medium
Bact. Tryp	10 g	12 g	10 g	20 g
bacto Agar	-	-	1.50%	-
Glucose	-	-	-	40 mL
Glycerin	-	4 mL	-	-
H ₂ O	1L	900 mL	1 L	960 mL
KCI	-	-	-	0.19 g
NaCI	10 g	-	10 g	0.58 g
рН	7.4		7.4	
Yeast Extract	5 g	24 g	5 g	5 g
$MgCl_2 \ge 6 H_2O$	-	-	-	2.03 g
$MgSO_4 \times 7 H_2O$	-	-	-	2.46 g

Tabelle 2: Nährmedien

3.2 Puffer

Alle Puffer wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt und aufgefüllt.

3.2.1 Protein-Aufreinigung

Puffer für die Affinitätschromatographie über eine Co/Ni-NTA-, GSH- und Chitinsäule.

	Komponente	Co/Ni-NTA-Sepharose	GSH-Sepharose	Chitinsäule
Lysepuffer	Tris	50 mM	50 mM	-
· ·	HEPES	300 mM	-	20 mM
	NaCI	-	300 mM	500 mM
	Glycerin	5%	5 %	10%
	Imidazol	10 mM	-	-
	BME	1-2 mM	2 mM	-
	EDTA	-	-	1 mM
	PMSF	1 mM	1 mM	1 mM
	рН	8.0	8.0	8.0
Waschpuffer	Tris	50 mM	50 mM	-
	HEPES	-	-	20 mM
	NaCl	500 mM	500 mM	1 M
	Glycerin	5%	5%	-
	Imidazol	25 mM	-	-
	BME	1-2 mM	2 mM	-
	EDTA	-	-	1 mM
	рН	8.0	8.0	8.0
Elutionspuffer	Tris	50 mM	-	-
	HEPES	-	50 mM	20 mM
	NaCI	300 mM	200 mM	-
	MgCl ₂	-	-	2 mM
	Glycerin	5%	5%	-
	Imidazol	250 mM	-	-
	BME	1-2 mM	2 mM	-
	Glutathion		10 mM	-
	рН	8.0	8.0	8.0
Cleavage-Puffer	HEPES	-	-	20 mM
	MgCl ₂	-	-	2 mM
	BME	-	-	50 mM
	рН	-	-	8.0
Dialysepuffer	HEPES	25 mM	20 mM	20 mM
	NaCl	100 mM	-	100 mM
	MgCl ₂	2 mM	5 mM	2 mM
	BME	4 mM	-	-
	TCEP	-	0.5 mM	0.5 mM
	рН	7.5	8.0	7.5

Tabelle 3: Puffer der Affinitätschromatographie

3.2.2 Gelelektrophorese/Western Blot

Der Gelpuffer wurde für die Herstellung der SDS-Gele verwendet.

Tabelle 4: Zusammensetzung des Gelpuffers

Gelpuffer	Tris3 M
	SDS 10 mM
	pH 8.45 mit HCl

Die folgenden Puffer wurden für den Western Blot verwendet. Der pH-Wert wurde nur überprüft und nicht nachträglich eingestellt.

Tabelle 5: Puffer des Western Blots

Transfer-Puffer	Tris 25 mM
	Glycin 192 mM
	Methanol 20% (v/v)
	рН 8,3
TBS	Tris-HCI 50 mM
	NaCI 150 mM
	MgCl ₂ 1 mM
	рН 7,8
TBS-T	TBS + 0,2 % Tween 20

3.2.3 Fluoreszenz-Polarisationsassay

Tabelle 6: Puffer des FP-Assays

Stammlösung (HBS) 10X	0.1 M HEPES
	1.5 M NaCl
	pH 7.4
FP-Puffer 1X	0.1 % (v/v) Tween 20
	0.1 %(w/v) BSA
	10 % (v/v) HBS

3.2.4 Oberflächenassay

Tabelle 7: Puffer des Oberflächenassays

Immobilisierungspuffer	25 mM Tris/HCI
	150 mM NaCl
	2 mM MgCl ₂
	pH 7.5
Waschpuffer	25 mM Tris/HCI
	150 mM NaCl
	2 mM MgCl ₂
	0.05 % (v/v) Tween 20
	pH 7.5
Blockingpuffer	25 mM Tris/HCI
	150 mM NaCl
	2 mM MgCl ₂
	0.05 % (v/v) Tween 20
	1 %(w/v) BSA
	pH 7.5

3.2.5 Kristallisation

Tabelle 8: Komplexierungspuffer der Kristallisation

Komplexierungspuffer	20 mM HEPES
	2 mM MgCl ₂
	2 mM BME
	рН 6.5

3.3 Bakterienstämme

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Escherichia coli-Stämme verwendet.

Zur Herstellung der Plasmide in hoher Kopienzahl wurde folgender Stamm verwendet:

XL10-Gold Ultracompetent Cells (Stratagene, La Jolla, USA)

Genotyp: Tetr Δ (*mcrA*)183 Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 end A1 supE44 thi-1 redA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacIqZ Δ M15 Tn 10 (Tetr) Amy Camr]

Desweiteren wurde die heterologe Expression eukaryotischer Proteine mittels des folgenden Stammes durchgeführt.

Rosetta[™] (DE3) (Merck, Nottingham, United Kingdom)

Genotyp: F- ompT hsdSB(rB-mB-) gal dcm (DE3) pRARE2 (CamR)

3.4 Primer

3.4.1 Primer für die ortsspezifische Mutagenese

Tabelle 9: Primer

Name	Eingeführte Mutation	5´ → 3´- Sequenz
Tau_2N4R_S214D_fw	S214D	CTCCCGCACCCCGGACCTTCCAACCCCA
Tau_2N4R_S214D_bw	S214D	GAGGGCGTGGGGCCTGGAAGGTTGGGGT
Tau_pTyb_\$324A_fw	S324A	GACCTCCAAGTGTGGCGCATTAGGCAACATCTG
Tau_pTyb_S324A_bw	S324A	CAGATGTTGCCTAATGCGCCACACTTGGAGGTC

3.4.2 Sequenzierprimer für den pTyb12 Vektor

Tabelle 10: Sequenzierprimer

Name	5 → 3 - Sequenz
Intein_fw	CCCGCCGCTGCTTTTGCACGTGAG
T7_term_bw	CTAGTTATTGCTCAGCGGT

3.5 Plasmide

Tabelle 11: Eingesetzte Plasmide

Vektor	Insert	Größe	Mutation	tag
pTYB12	Tau	AS 207 - 328	S324A	Intein
pTYB12	Tau	AS 207 - 328	S214D	Intein
pTYB12	Tau	AS 207 - 328	S214D, S324A	Intein
pGEX4T1	Leervektor			
pProEx HtB	14-3-3-eta	VL		His

3.6 Peptide / Proteine

Die FAM-markierten Peptide wurden für die FP-Messungen verwendet, während Tau-Tether ohne FAM für die Kristallisation verwendet wurde. Die für die Phosphorylierung und Mutation signifikanten Aminosäuren sind in rot dargestellt sind.

Peptid-/Protein- bezeichnung	Konstrukt- grenzen	Sequenz
FAM-Tau pS214	210 - 218	FAM-SRTP{ <mark>pS</mark> }LPTP
FAM-Tau pS324	320 - 328	FAM-SKCG{ <mark>pS</mark> }LGNI
FAM-Tau-Tether	211-218 (GGS)₃319-331	FAM-RTP{ <mark>pS</mark> }LPTGGGSGGSGGSKCG{ <mark>pS</mark> }LGNIHHK
Tau-Tether	211-218 (G) ₁₄ 319-328	RTP{ <mark>pS</mark> }LPTPGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
GST-Tau	207 - 328	GST-LVPRGS-GSRSRTP <mark>S</mark> LPTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAK SRLQTAPVPMPDLKNVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDL SNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDLSKVTSKCG <mark>S</mark> LGNI
GST-Tau S214D, S324D	207 - 328	GST-LVPRGS-GSRSRTPDLPTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAK SRLQTAPVPMPDLKNVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDL SNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQVYKPVDLSKVTSKCGDLGNI
GST-Tau S214A, S324A	207 - 328	GST-LVPRGS-GSRSRTPALPTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAK SRLQTAPVPMPDLKNVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDL SNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDLSKVTSKCGALGNI
Intein-Tau S214A,S324A	207 - 328	Intein-AGHM-GSRSRTPALPTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAK SRLQTAPVPMPDLKNVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDL SNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDLSKVTSKCGALGNI

Tabelle 12: Eingesetzte Proteine bzw. Peptide

Die 14-3-3-VL Proteine wurden für die Isoformspezifität-Messungen mit FAM-Tautether eingesetzt. Die Proteine mit ΔC TEV dienten der Kristallisation.

Tabelle 13: 14-3-3 Isoformen

14-3-3 Isoformen	Vektor	tag	Molekulargwicht [g/mol]
14-3-3-beta (β) VL	pPROEx HtB	His	31322,8
14-3-3-gamma (γ) VL	pPROEx HtB	His	31543
14-3-3-epsilon (ε) VL	pPROEx HtB	His	32414
14-3-3-eta (η) VL	pPROEx HtB	His	31459
14-3-3-sigma (σ) VL	pPROEx HtB	His	31014,4
14-3-3-tau (τ) VL	pPROEx HtB	His	31005
14-3-3-zeta (ζ) VL	pPROEx HtB	His	30985,5
14-3-3-beta (β) ΔC TEV			27083,5
14-3-3-gamma (γ) ΔC TEV			27832,3
14-3-3-eta (η) ΔC TEV			27782,4
14-3-3-zeta (ζ) ΔC TEV			26688,2

3.7 Geräteliste

Tabelle 14: Angewendete Geräte

Äkta Prime Plus	GE Healthcare, Freiburg, Germany
Fluoreszenzspektrometer	Infinite500, Tecan
Gelkammern	Biorad
Hochdruckhomogenisator	Microfluidics, Newton, MA, USA
Inkubatorschrank	WTC, Binder
Kreisschüttler	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany
Küvettenphotometer	BioPhotomoter 6131,Eppendorf, Hamburg, Germany)
PCR-Cycler	PTC-200, MJ Research
Photometer	NanoDrop, PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen,
	Germany
Photometer	BioPhotometer, Eppendorf
Proteingelelektrophoresekammern	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany
Schüttelinkubator	Innova 4430, Incubator Shaker, New Brunswick
	Scientific, Wesseling-Berzdorf, Germany
Semidry-Blot-Unit	TE 77 PWR, GE-Healthcare
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, Germany
Ultrazentrifuge	Avanti J30i, Beckmann
Vortexer	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
Zentrifugationskonzentrator	Amicon, Millipore GmbH, Schwalbach, Germany

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Ortsgerichtete Mutagenese

Die Ortsgerichtete Mutagenese bedient sich der Polymerasekettenreaktion (PCR) als methodisches Werkzeug um gezielt eine oder mehrere Mutationen in die DNA-Sequenz einzubauen.

Die PCR erfolgt in drei Temperaturschritten: Denaturierung, Annealing und Elongation, welche 20-40 Mal im Thermocycler wiederholt werden. Für den Erfolgreichen Ablauf einer PCR benötigt man Desoxynukleotidphosphate (dGTP, dATP, dCTP, dTTP), eine Polymerase und zwei Primer (einen für den Hauptstrang und einen für den Folgestrang).

Die Denaturierung läuft bei 95 °C ab und bewirkt, dass die DNA-Doppelstränge (dsDNA) nachher als Einzelstränge (ssDNA) vorliegen, indem die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Strängen gebrochen werden. Um zu gewährleisten, dass die komplette DNA als ssDNA vorliegt, erfolgt zu Beginn der PCR ein längerer Denaturierungsschritt. An den ssDNA-Strängen können sich anschließend die Primer anlagern (Annealing). Dies geschieht bei ca. 5 °C unterhalb des Schmelzptunktes der Primer. Während der Elongation verknüpft die Polymerase (bei 72 °C) die dNTPs zu neu amplifizierten DNA-Strängen.

Um die Punktmutation zu erreichen, benötigt man zwei zueinander komplementäre Oligonukleotide, welche die gewünschte Mutation enthalten. Als Polymerase wurde eine Pfu-Polymerase verwendet, da diese eine höhere Korrekturaktivität als beispielsweise eine Taq-Polymerase aufweist.

Bei der ortsgerichteten Mutagenese liegen nach der Elongation ssDNA-Stränge vor, die die Basen der Primer anstelle der ursprünglichen Basen tragen. Im Gegensatz zur Amplifikation von DNA-Fragmenten durch die PCR, wurde bei der ortsgerichteten Mutagenese das gesamte Plasmid mit dem gewünschten DNA-Fragment vervielfacht.

	95 °C	1 min	
Denaturierung	95 °C	1 min	
Annealing	55 °C	1 min 👌 30 Zyklen	
Elongation	72 °C	20 min 丿	
	72 °C	30 min	-

Die ortsgerichtete Mutagenese verlief nach folgendem Schema:

Die einzusetzende Menge an Primer berechnet sich nach der folgenden Formel:

$$\frac{125 ng \cdot 1000}{330 \cdot N} = n (Primer) \tag{1}$$

Wobei N für die Anzahl der Basenpaare des Primers und n für die einzusetzende Stoffmenge des Primers stehen. Das Volumen kann über c = n/V berechnet werden.

Pfu-10x-Puffer	5 µL
dNTP-Mix (10 mM)	1 µL
DNA	40 -100 ng
Primer_fw	xμL
Primer _bw	xμL
ddH ₂ O	auf 50 µL auffüllen
PfuHotstart Turbo	1 μL
Polymerase (2.5 U)	

Tabelle 15: Pi	pettierschema (der Ortsger	ichteten N	/lutagenese

Nach Ablauf der PCR-Zyklen wurde die methylierte parentale DNA mithilfe der Restriktionsendonuklease DpnI (1 µL) verdaut, während die neu amplifizierte unmethylierte Plasmid-DNA zurückblieb.

4.1.2 Transformation / Plasmidpräparation

Bei der Hitzeschocktransformation wurden vorhandene Plasmide in chemisch kompetente Zellen übertragen, um diese anzureichern.

Es wurden 1-2 µL DNA bei einer Retransformation, d.h. es wurden superspiralisierte Plasmide eingesetzt, die bereits aus *E. coli*-Zellen isoliert wurden, und ca. 5 µL DNA bei einer Ersttransformation in 100 µL kompetente *E. coli* XL10-Zellen gegeben. Zusätzlich wurden 3,5 µL DTT bei einer Ersttransformation dazu pipettiert. Darauf folgte eine 20-30 Minütige Inkubation auf Eis. Der Hitzeschock-Schritt erfolgte bei 42 °C für 45 bis 60 Sekunden. Nach erneuter Inkubation auf Eis für 5 Minuten wurde raumtemperiertes SOC-Medium (1 mL) hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C für 1,5 Stunden geschüttelt. Erfolgte nach der Transformation eine Plasmidpräparation, wurden die Zellen bei 13.000 rpm und 30 Sekunden pelletiert und in etwa 50 µL Medium resuspendiert. Zum Schluss wurden die Zellen auf einer LB-Agarplatte ausplattiert und über Nacht im Inkubator bei 37 °C inkubiert. Durch Zusatz von Ampicillin (50 µg/mL) im LB-Agar wurde gewährleistet, dass nur die gewünschten Zellen auf dem Agar sich anreichern können, da diese durch das transformierte Plasmid über eine Ampicillinresistenz verfügen. Einzelkolonien wurden von der LB-Platte gepickt und in 5 mL steriles Ampicillin haltiges LB-Medium gegeben und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 1 min geerntet und daraus die Plasmid-DNA der mutierten in XL10-Zellen extrahiert. Es wurde das Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot, Germany) nach Angaben des Herstellers angewendet.

4.1.3 Sequenzier-PCR

Mittels der Sequenzier-PCR kann die Sequenz eines DNA-Stranges und somit der Erfolg einer Ortsspezifische Mutagenese überprüft werden. Im Gegensatz zur Standard PCR wird nur ein Primer eingesetzt. Der entweder Vorwärts oder Rückwärts ausgerichtet Primer lagert sich in der Annealing-Phase an den Haupt-oder Folgestrang an und die Polymerase amplifiziert neue DNA-Stränge. Bei der Sequenzier-PCR werden nicht nur dNTPs, sondern auch ddNTPS (Didesoxynucleotidphosphate) eingesetzt. Wird ein ddNTP eingebaut, kann die Polymerase den Strang nicht weiter verlängern, da die dafür notwendige Hydroxyl-Gruppe fehlt. Demnach liegen am Ende der Sequenzier-PCR neu amplifizierte DNA-Fragmente, die sich in der Länge und endständigen Base unterscheiden, vor. Die Fragmente werden anschließend elektrophoretisch nach der Größe aufgetrennt. Durch Analyse der endständigen Basen kann somit auf die Sequenz des ursprünglichen DNA-Stranges geschlossen werden.

Tabelle 16: Pip	pettierschema der	Sequenzier-PCR
-----------------	-------------------	----------------

DNA	etwa 400 ng
Primer_fw (Vektorspezifisch)	1 µL
Terminator Mix (<i>Big</i> Dye®Applied Biosystems)	2 µL
ddH ₂ O	auf 20 µL auffüllen

4.1.4 DNA-Fällung

Aus dem Produkt der Sequenzier-PCR wurde die DNA mittels Ethanol-Fällung isoliert. Die 20 μ L der Sequenzier-PCR wurden in 0,5 mL Reaktionsgefäße überführt und zusätzlich 55 μ L EtOH (100 %), 2 μ L NaAc (3 M) und 2 μ L EDTA (125 mM) hinzugegeben. Nach anschließendem vortexen wurde für 10 Minuten bei RT inkubiert. Darauf folgte eine 20 minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen und es wurden 75 μ L EtOH (75 %) hinzugefügt. Nach erneuter Zentrifugation bei 13.000 rpm für 10 Minuten wurde der Überstand entfernt und die DNA bei RT getrocknet.

Nach der Fällung des Produktes aus der Sequenzier-PCR wurden die Proben hausintern am Max-Planck Institut für molekulare Physiologie auf einem DNA-Sequencer ABI 373 Applied Biosystems analysiert.

4.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren beruht auf dem Lambert-Beer´schen Gesetz und wird über die Messung der Absorption der Lösung bestimmt. Durch das Verhältnis der gemessenen Lichtintensität nach Durchtritt durch die Probe (I) und der Lichtintensität vor Durchtritt durch die Probe (I₀) kann die Absorption (A) bestimmt werden.

$$A = -\log_{10}\frac{I}{I_0} \tag{2}$$

Die Konzentration kann mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten (ε), der Schichtdicke(d) und folgender Formel berechnet werden.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d \tag{3}$$

Die Konzentration wurde photometrisch im Mikrolitermaßstab (NanoDrop) bestimmt. Zunächst wurde die Apparatur mit HCI und anschließend bidestilliertem Wasser gereinigt. Als blank diente hier bidestilliertes Wasser.

4.2 Mikrobiologische und proteinbiochemische Methoden

4.2.1 Proteinexpression

Die Proteinexpression erfolgte in dieser Arbeit in einer *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS-Kultur. Der Expressionsstamm wurde mit dem Plasmid transformiert, welches für das zu exprimierende Protein codiert. Für die Vorkultur wurden etwa 100 mL TB-Medium mit Ampicillin (100 µg/mL) versetzt und mit den entsprechenden Zellen angeimpft. Anschließend wurde diese Vorkultur für 12-15 Stunden bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Zur Proteinexpression wurden 5 L mit Ampicillin versetztes TB-Medium mit der Vorkultur angeimpft. Die Zellen wurden bei 37 °C im Schüttelinkubator hochgezogen, bis eine OD₆₀₀ von 0,6-0,8 erreicht wurde. Anschließend wurde die Genexpression induziert, indem 0,4 mM des Galaktoseanalogons Isopropylthiogalaktopyranosid (IPTG) hinzugegeben wurden. Da das in den Vektor eingebaute Gen des Zielproteins unter Kontrolle des Iac-Promotors steht, erfolgt durch IPTG-Zugabe die Transkription der eingeführten Sequenz. Die Expression erfolgte über einem Zeitraum von 15 Stunden bei 20 °C.

Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation bei ca. 4000 rpm geerntet und das Pellet zur Weiterverarbeitung verwendet oder bei -20 °C eingefroren.

4.2.2 Zellaufschluss

Zur Weiterverarbeitung wurde das Pellet in ca. 50 mL Lysepuffer resuspendiert und mit 2·10⁻⁴ mg/mL DNasel versetzt. Darauf folgte der mechanische Zellaufschluss per Hochdruckhomogenisierer (Microfluidizer). Das Lysat wurde 3-4 Mal durch den Microfluidizer gegeben, bis die Flüssigkeit klarer wurde. Um die Proteinfraktion von Zelltrümmern zu trennen, wurden diese für 30 Minuten bei 25000 rpm und 4 °C sedimentiert und der Überstand für die Proteinaufreinigung eingesetzt. In dieser Arbeit wurde nur mit gut löslichen Proteinen gearbeitet, weswegen gewährleistet war, dass sich das Protein nach Zentrifugation im Überstand befand.

4.2.3 Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung von Proteinen wurde mittels Affinitätschromatographie erreicht. Das Prinzip der Affinitätschromatographie beruht darauf, dass das aufzureinigende Protein mit einem N-oder C-terminalen Affinitäts-*tag* versehen wurde, welcher reversibel und hoch affin an die Säulenmatrix bindet. Es entsteht ein stabiler Komplex, welcher gewährleistet, dass die Proteine spezifisch an der Säulenmembran haften und somit immobilisiert sind. Demnach können andere Proteine und Makromoleküle von der Säule gewaschen werden. Die Elution des Proteins erfolgt durch eine kompetetive Verdrängung nach Zugabe eines geeigneten Kompetitors in hoher Konzentration, oder durch Trennung des Targetproteins vom Affinitäts-*tag* auf der Säule.

In dieser Arbeit wurden Aufreinigungen mit drei verschiedenen Affinitäts-*tags* und Säulenmaterialien durchgeführt. Alle verwendeten Affinitäts-*tags* sind der Tabelle 17 zu entnehmen.

Affinitäts- <i>tags</i>	Eigenschaften	Säulenmaterial	Elution
His- <i>tag</i>	Hexapeptid aus Histidin	Co/Ni-NTA	Imidazol
GST- <i>tag</i>	Fusionsprotein aus Gluthation-S-Transferase und dem aufzureinigendem Protein	Glutathion Sepharose	Reduziertes Glutathion (GSH)
Intein- <i>tag</i>	Fusionsprotein aus Intein, welches eine Chitin-Binde- Domäne enthält und dem aufzureinigendem Protein	Chitin	β-Mercaptoethanol

Tabelle 17: Verschiedene Affinitäts-tags und ihre Wirkweise

Die affinitätschromatographische Aufreinigung der Proteine erfolgte mit Hilfe des Pumpsystems Äkta-Purifier (GE Healthcare) bei 4 °C.

4.2.3.1 Co-NTA-Sepharose-Säule

Die 14-3-3 Proteine wurden mittels des His-*tags* aufgereinigt. Bei der Affinitätschromatographie über einen His-*tag* bindet dieser reversibel an Ni²⁺⁻ Metallionen, die vierfach koordiniert an Nitrilessigsäure-Agarose (NTA) chelatisiert sind. Das Protein wurde mit Hilfe von Imidazol, welches eine Struktur analog zu den Histidin-Seitenketten besitzt, eluiert. Aufgrund der kleineren Molekülmasse, weist

Imidazol eine höhere Affinität gegenüber der Säulenmatrix auf, als das His-*getaggte* Protein und verdrängt dieses.

Zunächst wurde die Säule mit 3-fachem Säulenvolumen (SV) (ca. 90 mL) mit Lysepuffer äquilibriert (4 mL/min). Nach beladen der Säule mit 2 mL/min über eine Peristaltikpumpe, wurde die Säule mit 20 SV Waschpuffer gewaschen (4 mL/min). Anschließend folgte die Fraktionierung des Proteins mit 3 SV Elutionspuffer und einem Fluss von 2 mL/min. Während der Elution wurde die Absorption der Fraktionen bei 280 nm detektiert, wodurch überprüft werden konnte, in welcher Fraktion sich das gesuchte Protein befindet.

4.2.3.2 GSH-Sepharose-Säule

In dieser Arbeit wurde mittels der GSH-Sepharose-Säule Glutathion-S-Transferase (GST) aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgt nach demselben Prinzip wie zuvor beschrieben. Es kann ein Fusionsprotein mit einem GST-*tag* versehen werden, oder wie in dieser Arbeit Glutathion-S-Transferase aus dem Vektor aufgereinigt werden. Glutathion (GSH) ist ein Tripeptid, bestehend aus Glu-Cys-Gly. Im reduzierten Zustand bindet GST über die reduzierte Sulfhydrilgruppe an das Glutathion der Säulenmatrix. Wird nun am Ende reduziertes Glutathion in hoher Konzentration hinzugegeben, wird das Protein verdrängt und kann eluiert werden.

Die Durchführung der Affinitätschromatographie erfolgte entsprechend dem Verlauf mit Co-NTA-Sepharose.

4.2.3.3 Chitin-Säule

Die Proteindomäne des Tau₂₀₇₋₃₂₈ wurde über eine Chitin-Säule aufgereinigt. Bei dieser Aufreinigungsmethode ist das Protein an ein Intein-CBD-*tag* gekoppelt. Dieser bindet über die Chitin-binde-Domäne an die Säulenmatrix. Die Elution des Proteins erfolgt über eine Intein vermittelte Spaltung des Proteins vom *tag* und somit von der Säule. Dies wird durch Thiole erreicht, die die Spaltung induzieren.

Aufgrund der geringeren Stabilität des Säulenmaterials musste mit einem geringeren Druck gearbeitet werden. Demnach wurde während der Aufreinigung nur die Peristaltikpumpe des Pumpsystems Äkta-Purifier verwendet. Die Säule wurde zunächst mit 3 SV Lysepuffer bei 2 mL/min äquilibriert. Der Überstand wurde mit 1 mL/min aufgetragen. Darauffolgte der Wasch-Schritt mit 15 SV Waschpuffer bei 4 mL/min. Die Elution erfolgte in drei Schritten. Zunächst wurden 3 SV Elutionspuffer ohne BME auf die Säule übertragen (4 mL/min) und danach 3 SV *Cleavage*-Puffer mit BME (5 mL/min). Anschließend wurde der Säulenfluss gestoppt und die Säule bei RT für 15 Stunden gelagert. Das BME bewirkt das Splicen des Inteins, wodurch das Tau-Protein in einem Schritt von der Säule und dem *tag* getrennt wurde. Letztendlich wurde das Targetprotein mit Elutionspuffer ohne BME (3 SV) bei 1,5 mL/min fraktioniert.

Zum Schluss wurden bei allen Proteinaufreinigungen die Eluate mit identifiziertem Protein zusammengelegt und auf 2-3 mL einkonzentriert. Dies geschah mittels Zentrifugationsfiltern (Amicon-Ultra) mit den jeweilig dem Protein entsprechenden Größen des MWCO (*Molecular Weigt Cut-Off*).

4.2.4 Gelfiltrationschromatographie

Mit Hilfe der Gelfiltrationschromatographie können Makromoleküle nach ihrer Größe und Form getrennt werden. Das Säulenmaterial besteht aus einer stationären Phase aus Gelkügelchen mit Poren. Dieses Gel fungiert als molekulares Sieb. Die Laufgeschwindigkeit hängt von dem Diffusionsvolumen der Moleküle ab. Kleinere Moleküle können in die Poren eindringen und benötigen eine längere Laufzeit, da sich das Diffusionsvolumen vergrößert als bei großen Molekülen, die von dem Gel ausgeschlossen werden. Dieser Effekt hat zur Folge, dass größere Makromoleküle die Säule schneller durchlaufen als kleinere.

Die Gelfiltrationschromatographie diente in dieser Arbeit zur weiteren Aufreinigung des Tau₂₀₇₋₃₂₈. Die Säule wurde zunächst mit 3 SV (etwa 900 mL) des Chitin-Dialysepuffers bei einem Fluss von 0,5 mL/min äquilibriert. Nach Waschen der Probenaufgabeschleife wurde die Proteinlösung mit einer Flussrate von 1,5 mL/min auf die Säule geladen.

Die Elution verlief bei 1 mL/min mit 1 SV (200 mL) Puffer, wobei in 3 mL fraktioniert wurde.

4.2.5 Dialyse

Dialysen dienen dem Entsalzen und Umpuffern von Proteinlösungen. Diese Vorgänge finden über semipermeable Membranen statt, die kleine Moleküle unterhalb einer bestimmten Ausschlussgrenze (MWCO, *Molecular Weight Cut-Off*) heraus diffundieren lassen und große zurückhalten. Die Proteinlösung wurde mithilfe einer Spritze in die äqulibrierte Dialysekassette bzw. dem Dialyseschlauch übertragen.

Je nach Proteingröße wurden Dialysekassetten mit einem MWCO von 5-30 kDa verwendet. Für das 14-3-3-η-Protein wurden 20 kDa, für das GST aus pGEX4T1 30 kDa Dialysekassetten und für Tau 5 kDA-Dialyseschlauch verwendet. Die Dialysemembranen wurden anschließend gegen 2 L Dialysepuffer unter leichtem Rühren für 15 Stunden bei 4 °C dialysiert. Anschließend wurde erneut für 2 Stunden bei 4 °C in frisch angesetztem Dialysepuffer dialysiert.

4.2.6 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Proteinkonzentration wurde photometrisch, auf Basis des Lambert-Beer'schen Gesetztes, bestimmt. Die Absorption von Proteinen wird größtenteils durch die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan und mit einem geringeren Anteil auch durch Disulfidbrücken verursacht. Gemessen wird die Absorption bei 280 nm. Unter Berücksichtigung des unterschiedlichen Einflusses der soeben genannten Komponenten, kann der Extinktionskoeffizient bei 280 nm spezifisch für jedes Protein berechnet werden. Da Phenylalanin bei 280 nm eine sehr geringe Absorption aufweist, wird die Aminosäure bei der Berechnung nicht beachtet.

$$\varepsilon_{280}[M^{-1}cm^{-1}] = 5500 n_{Trp} + 1490 n_{Tyr} + 125 n_{SS}$$
(4)

Wobei n für die Anzahl der jeweiligen Aminosäuren steht. Die Konzentration kann wie in Kap. 4.1.5 beschrieben anhand der Gleichung (3) berechnet werden.

Bei der Konzentrationsbestimmung von Proteinen diente der Dialysepuffer als Nullprobe und wurde mit jeweils 1,5 µL Proteinprobe am Mikroliterphotometer (NanoDrop) ausgeführt. Befand sich die Konzentration bei einem Wert über 90 mg/mL wurde die Probe verdünnt und erneut gemessen.

4.2.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE ist eine Methode zur Überprüfung der Reinheit und des Molekulargewichtes von Makromolekülen. Die Auftrennung der Moleküle erfolgt auf einem Trägermaterial, hier Polyacrylamid, in einem elektrischen Feld. Durch Zugabe von Natriumdodecylsulfat wird die Tertiärstruktur der Proteine zerstört, indem das Detergenz an die hydrophoben Bereiche des Proteins bindet. Zudem liegen alle Proteine nach Behandlung mit Natriumdodecylsulfat in stark negativer Form vor. Demnach wird gewährleistet, dass die Proteine nur in Abhängigkeit ihrer Größe und nicht ihrer Ladung unterschiedlich weit zu den Elektroden wandern. Polyacrylamid eignet sich besonders gut als Trägermaterial, da es chemisch inert, stabil und hydrophil ist. Dieses Polymer wird durch Copolymerisation von Acrylamid und N,N⁻.Methylenbisacrylamid synthetisiert. Mittels Variation der Konzentrationen und dem Verhältnis der Ausgangsstoffe, kann die Porengröße verändert werden. Die Porengrößen dienen als molekulares Sieb, durch welches die kleinen Moleküle schneller wandern als großen.

In dieser Arbeit wurde mithilfe Der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese die Reinheit der aufgereinigten Proteine überprüft. Es wurden zwei verschiedene Porengröße der Gele für unterschiedliche Proteinaufreinigungen benötigt.

	Trenngel 12 %	Trenngel 15 %	Sammelgel 5 %
ddH2O [mL]	3,2	2,2	2,1
Gelpuffer [mL]	2,5	2,5	0,38
Bis-Acrylamid (30%) [mL]	3,9	4,9	0,5
APS [µL]	100	100	50
TEMED [µL]	10	10	5

Tabelle 18: Zusammensetzung d	der Gele für die SDS-PAGE
-------------------------------	---------------------------

Die Proben wurden mit 5 x SDS-Probenpuffer verdünnt und für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese wurde bei 60 mA in Gelelektrophoresekammern durchgeführt. Die Kammer wurde mit Anodenpuffer (200 mM Tris) und mit Kathodenpuffer (100 mM Tris, 100 mM Tricine, 0,1 % SDS) gefüllt. Die Proteinbanden wurden durch Färbung mit Coomassieblau sichtbar gemacht. Die Färbung erfolgte für 10-20 Minuten auf dem Schüttler. Mit einer Entfärberlösung wurde das Gel entfärbt, während die Proteinbanden sichtbar blieben.

4.2.8 Western Blot

Diese Methode dient zum eindeutigen Nachweis der zu untersuchenden Proteine über spezifische Antikörper. Die Proteingemische, welche zuvor mittels Gelelektrophorese auf einem Gel aufgetrennt wurden, werden auf eine Cellulose-Membran übertragen. Dies geschieht, indem ein elektrisches Feld senkrecht zu dem Gel und der Membran angelegt wird. Sind die Proteine auf der Membran immobilisiert, wird der erste Antikörper aufgetragen. Dieser bindet spezifisch an das gesuchte Protein. Darauffolgend wird ein zweiter Antikörper aufgetragen, welcher an den ersten Antikörper bindet. An den zweiten Antikörper ist eine Alkalische Phosphatase gekoppelt, welche mit BCIP/NBT eine Nachweisreaktion erzeugt.

In dieser Arbeit wurde mithilfe des Western Blots die Expression des Proteins Tau nachgewiesen. Nachdem die Proben auf einem SDS-Gel aufgetrennt wurden, wurden das Gel und die Cellulose-Membran für 15 Minuten in Transferpuffer eingeweicht. Anschließend wurde die Blotting-Apparatur wie folgt zusammen gebaut:

> Whatmanpapier (unten) Nitrocellulose-Membran Protein-Gel Whatmanpapier (oben)

Das Whatmanpapier wurde kurz in Transferpuffer äqulibriert. Es muss beim Aufbau des Blots zudem darauf geachtet werden, dass keine Blasen zwischen den Membranen vorhanden sind, um einen fehlerfreien Transfer der Proteine auf die Membran zu gewährleisten. Geblottet wurde bei 240 mA für 20 Minuten. Anschließend wurde die Membran für 1 Stunde bei RT mit Milchpulver (5 % in TBS-Puffer) geblockt, um unspezifische Bindungsstellen zu sättigen. Bevor der erste Antikörper hinzugegeben wurde, wurde die Membran 2 Mal für 5-10 Minuten mit TBS gewaschen. Der Antikörper wurde 1:1000 in TBS-Puffer plus eine Spatelspitze BSA verdünnt und für 12-14 Stunden bei 4 °C auf die Membran übertragen. Nachdem die Membran anschließend 3 Mal mit TBS-T gewaschen wurde, erfolgte die Zugabe des zweiten Antikörpers (Anti-mouse IgG, AP-linked).

Nach 4 Stunden Inkubatonszeit bei RT erfolgte nach 2 maligem Waschen mit TBS die Farbnachweisreaktion mit BCIP/NBT. Es wurden ca. 3 mL des Reagenz auf die Membran pipettiert und je nach Stärke der Färbung für kurze Zeit im Dunkeln inkubiert.

4.3 Biophysikalische Methoden

4.3.1 Fluoreszenz-Polarisation

Wird ein kleines Fluorophor, welches frei im Raum beweglich ist, mit linear polarisiertem Licht angeregt, rotiert das Molekül während der Fluoreszenzlebenszeit und es wird eine Änderung der Fluoreszenzpolarisation gemessen. Diese Änderung äußert sich in depolarisiertem emittiertem Licht, welches detektiert wird. Ist das Molekülvolumen des Fluorophor jedoch effektiv größer, erfolgt eine langsamere Rotation während der Fluoreszenzlebensdauer und das emittierte Licht bleibt stärker polarisiert. Je größer der Unterschied des Molekularvolumens von Rezeptor und Ligand ist, desto optimaler wird das Signal-Rausch-Verhältnis, da der Unterschied der Rotationsgeschwindigkeit des gebundenen und freien Fluorophors größer ist. Gemessen wurden die Emissionsintensitäten parallel und senkrecht zur Anregungspolarisation des Fluorophors. Hieraus ergaben sich die Werte der Anisotropie, welcher zur weiteren Analyse verwendet wurden.



Abbildung 5: Schema der Fluoreszenzpolarisationsmessung nach Technical Resource Guide von Invitrogen

Mithilfe der Fluoreszenz-Polarisation (FP) wurde die Protein-Ligand-Wechselwirkung mit und ohne Zusatz von Substanzen/Wirkstoffen getestet und bestimmt. Als Rezeptor (Protein) wurden in diesem Fall die sieben humanen 14-3-3-Isoformen eingesetzt. Das Fluorescein (FAM) markierte doppeltphosphorylierte Peptid Tau und die einzelphosphorylierten Tau-Peptide(siehe Tabelle 12 Kap. 3.6) dienten als Ligand. Die Konzentration des Liganden wurde konstant bei 20 nM gehalten, während unterschiedliche Isoformen der 14-3-3-Proteine dazu (1:1) dazu titriert wurden.

Zur Analyse der Daten mit Hilfe des Programmes Graph Pad Prism wurde die gemessene Anisotropie gegen die Ligandkonzentration aufgetragen und es wurde eine Bindungsisotherme erhalten. Desweiteren konnte mittels nicht-linearer Regression die Dissoziationskonstante (K_D) bestimmt werden. Zur Berechnung wurde die Formel (5) verwendet.

$$y = [(B_{max} \cdot x)/(K_{D} + x)] + NS \cdot x + Hintergrund$$
(5)

Bmax ist die maximale Bindung, die erreicht wurde, x ist die Protein-Konzentration (14-3-3), NS ist der Anstieg der nicht-spezifischen Bindung und der Hintergrund umfasst die Menge der nichtspezifischen Bindung ohne fluoreszenzmarkiertem Bindepartner.

Für die Untersuchung der Protein-Ligand-Wechselwirkung in Anwesenheit eines Inhibitors oder Stabilisators, wurden die Rezeptor- und die Ligandkonzentration konstant gehalten. Zunächst wurde eine geeignete Konzentration der 14-3-3-Proteine bestimmt. Diese ließ sich aus der logarithmierten Auftragung der gemessenen Anisotropie gegen die Proteinkonzentration aus dem sigmoidalem Kurvenverlauf ablesen. Die Funktion des Kurvenverlaufes ist der Formel (6) zu entnehmen.

$$y = \frac{100}{(1 + 10^{(\log EC50 - x)})}$$
(6)

Für eine Stabilisierung der Bindung, wurde eine Konzentration des 14-3-3 Proteins gewählt, bei der noch keine Sättigung des Proteins mit dem Ligand vorlag. In der logarithmischen Darstellung liegt diese Konzentration unterhalb der linearen Steigung. Analog wurde zum Messen einer Inhibierung der Bindung durch Substanzen eine Konzentration von 14-3-3 gewählt, bei der noch fast keine Sättigung des Proteins mit dem Ligand erreicht ist. In der logarithmischen Darstellung liegt diese Konzentration oberhalb der linearen Steigung. Anschließend wurden die Stabilisatoren bzw. die Inhibitoren titriert. Nachdem je eine Komponente pipettiert wurde, erfolgte ein Zentrifugationsschritt. Es wurden schwarze 384-Well Assay-Platten verwendet und die Messung am Plattenlesegerät (TECAN Infinite) durchgeführt. Bei der Messung mit den Fluorescein-markierten Peptiden wurde mit einer Extinktionswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm gemessen.

4.3.2 Oberflächenbasierter Fluoreszenzassay

Eine weitere Möglichkeit Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen zu testen ist der oberflächenbasierte Fluoreszenzassay. Im Vergleich zu dem FP-Assay wird der Rezeptor (hier die zwei GST-fusionierten Tau-Phosphomimikry) an eine Polystyren beschichtete und für Proteine hoch affine Platte gebunden und der zweite Bindungspartner hinzugefügt. Dieser ist mit einem Fluorophor fusioniert. Mit dieser Methode wurde wiederum die Wechselwirkung zwischen Phosphomimikry Tau-Peptiden und 14-3-3 untersucht. Die Tau-Peptide waren mit einem GST-*tag* versehen und die 14-3-3-Proteine mit dem Fluorophor GFP.

Die Phosphomimikry Tau₂₀₇₋₃₂₈S214A,S324A und Tau₂₀₇₋₃₂₈S214D,S324D wurden in eiskaltem Immobilisierungspuffer auf 0,02 μ g/ μ L verdünnt und es wurden je 100 μ L in die Wells pipettiert. Um die Ergebnisse statistisch zu validieren, wurden dreifach Bestimmungen durchgeführt.

Die Platte wurde für 1 Stunde bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Darauf folgte ein Waschschritt. Hier wurde die Platte zunächst ausgeschlagen und kurz mit je 100 µL Waschpuffer pro Well inkubiert. Um unspezifische Stellen zu sättigen, wurde für die Platte für 1 Stunde bei 4 °C mit 200 µL Puffer pro Well geblockt. Nachdem dreimal mit je 100 µL Puffer pro Well gewaschen wurde, wurde der Interaktionspartner, verdünnt in Immobilisierungspuffer, dazutitriert. Anschließend wurde die Platte für 2 Stunden erneut bei 4 °C inkubiert. Die Messung erfolgte nach drei erneuten Waschgängen am Plattenlesegerät (TECAN Infinite). Die Wellenlängen der Fluoreszenz-Intensitätsmessung betrugen 485 nm (Extinktion) und 535 nm (Emission). Durch die Waschschritte wurden nicht gebundene Proteine entfernt. Demnach wurde nur die Fluoreszenz der an Tau gebundenen 14-3-3 Proteine detektiert.

4.3.3 Proteinkristallisation

Die Strukturbiologie bedient sich der Methode der Kristallisation, um die dreidimensionale Struktur der Proteine aufzuklären und so deren grundlegende Eigenschaften wie Bindungsverhalten besser analysieren zu können. In nativer Form liegen Proteine gelöst vor. Bilden sich im Laufe der Zeit Proteinkristalle, so können diese mittels spezieller Apparatur mit Röntgenstahlen beschossen werden, so dass mehrere Beugungsbilder, die für die Lösung der dreidimensionalen Proteinstruktur wichtig sind, entstehen. Dabei ist die Auflösung ein wichtiger Faktor um Proteinstrukturen auf atomarer Ebene untersuchen zu können.

4.3.3.1 Komplexbildung

In dieser Arbeit wurden Komplexe des doppeltphosphorylierten Peptids Tau_{211-318(GGS)3x-319-328}pS214,pS328 (Tau-Tether) mit den 14-3-3 Δ C Isoformen β , γ , η und ξ untersucht. Die Komplexe wurden mit einer Gesamtproteinkonzentration von 20 mg/mL im Verhältnis 1:1,5 (14-3-3 Monomer : Peptid) angesetzt.

Die Kristallisation des Komplexes wird per Dampfdiffusionsmethode erreicht. Hierbei gibt es zwei unterschiedliche Methoden, die des sitzenden und die des hängenden Tropfens. Dabei wird ein Tropfen des Protein-Komplexes mit einem Tropfen der Präzipitationslösung vermischt und entweder hängend oder sitzend neben dem Reservoir der Präzipitationslösung platziert wird.



Abbildung 6: Schema des hängenden Tropfens (A) und des sitzenden Tropfens (B) (Vadim, 2009).

Die Dampfdiffusionsmethode beruht auf einer Gleichgewichtseinstellung zwischen zwei Lösungen, die über eine Gasphase verbunden sind. Es bildet sich ein eine gesättigte
Gasphase zwischen der Lösung im Reservoir und dem Proteintropfen, wodurch die Wassermoleküle aus dem Proteintropfen in das Reservoir übergehen. Demnach verringert sich das Volumen des Tropfens und die Proteinkonzentration sowie die Präzipitanzkonzentration steigen an. Auf diesem Effekt beruhend, kommt es zur Kristallkeimbildung in dem Protein-Tropfen, was zum Kristallwachstum führt. Um optimale Bedingungen zur Kristallisation des Proteins herauszufinden, wurden Präzipitanzlösungen unterschiedlicher Zusammensetzungen in einem Initialscreen getestet. Die wichtigsten Parameter, welche variiert werden sind die Konzentrationen der Inhaltsstoffe, der pH-Wert sowie unterschiedliche Salzlösungen.

Für die Kristallisation des Tau-Tether mit den 14-3-3-Isoformen, wurde die Methode des sitzenden Tropfens gewählt. Mit Hilfe eines Hochdurchsatz-Pipettierroboters (Phoenix) wurden auf einer 96-Well-Platte (Corning) je drei verschiedene Komplexlösungen platziert. Die unterschiedlichen Präzipitationsbedingungen stammten aus dem JCSG-Core I-IV Screen (Qiagen). Die Platten wurden anschließend bei 4 °C gelagert und das Wachstum der Kristalle mittels automatischem Beobachtungssystem Formulatrix-Imager (Formulatrix, Waltham, USA) beobachtet.

4.3.3.2 Röntgenstrukturanalyse

Um den Kristall zu vermessen, muss dieser zunächst aus der Präzipitanzlösung heraus in eine in eine cryogenen Lösung übertragen werden. Die cryogene Lösung dient dem Schutz des Kristalles, beim Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff. Ohne ausreichenden Schutz vor Frostschäden würden Wasserkristalle entstehen, die den Proteinkristall beschädigen und die Messung der Röntgenbeugung stören würden. Demnach beinhaltet solch eine Lösung anstatt Wasser eine viskose Lösung wie zum Beispiel Glycerin. Der Kristall wurde mit Hilfe einer Nylonschleife aus der Lösung gefischt und in mit dieser Nylonschleife in die cryogene Lösung überführt. Anschließend wird der Kristall samt Loop in Stickstoff eingefroren.

Die Röntgenapparatur, mit welchem die Messung durchgeführt wurde, besitzt eine Kupfer-Drehanode. Über diese Anode werden Röntgenstrahlungen erzeugt, die durch einen Monochromator gefiltert werden und anschließend auf den Kristall treffen. Die Atome im Kristall sind in regelmäßigen Einheitszellen im Kristallgitter angeordnet, welches in der Lage ist, die eintreffende monochromatische Strahlung zu streuen bzw.

zu beugen. Demnach wird ein Streubild erhalten, welches das Beugungsmuster des Kristalles wiedergibt. Aus den mehreren Beugungsbildern kann mit Hilfe mathematischer Berechnungen die Elektronendichte-Verteilung der einzelnen Atome des Proteinkristalls bestimmt werden.

Die Auswertung der erhaltenen Diffraktionsbilder erfolgte mittels verschiedener Computerprogrammen. Zunächst wurde die Datenreduktion durchgeführt, um eine Dichtefunktion aus den Datensätzen zu erhalten. Hierbei wurde das Programm XDS verwendet (Kabsch, 2010). Anschließend folgte der molekulare Ersatz mit den Programmpaketen PHASER (McCoy et al., 2007) und CCP4i (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994). Dieses Modell dient der Bestimmung der Position und Orientierung der Moleküle in der Einheitszelle. Die Kristallstruktur wurde mit den Programmen WINCOOT (Emsley & Cowtan, 2004) und REFMAC (Murshudov *et al.*, 1997) validiert. Zur Anfertigung der Strukturbilder diente das Programm PyMol (www.pymol.org).

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Proteinaufreinigung

Für die unterschiedlichen Bindungsstudien wurden zunächst Proteine aufgereinigt. Die Stabilisierung und die Inhibierung der Wechselwirkung von Tau mit 14-3-3 Proteinen wurde mit der 14-3-3 Isoform η durchgeführt. Für die Untersuchung der Phosphorylierungsabhängigkeit der Wechselwirkung von Tau mit 14-3-3 wurde das Protein (Glutathion-S-Transferase) GST aufgereinigt. Für weitere Bindungsstudien, die im Verlauf dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden konnten, wurde Intein-Tau aufgereinigt.

5.1.1 Expression und Aufreinigung von 14-3-3η

Zur Exprimierung des Proteins 14-3-3 η wurde zuerst eine Plasmidtransformation des Plasmidvektors pProEx HtB in *E. coli*-Rosetta DE3-Zellen gemäß Abschnitt 4.1.2 durchgeführt. Darauffolgte eine Exprimierung der Zellen in TB-Medium (siehe Abschnitt 4.2.1). Die Aufreinigung der 14-3-3 Isoform η erfolgte mittels Affinitätschromatographie gemäß dem Protokoll in Kap. 4.2.3.1. Es wurde 14-3-3 η über eine Co-NTA-Sepharose-Säule aufgereinigt. Der Erfolg der Aufreinigung und die Reinheit der Proteine sind am folgenden Gelbild der Abbildung 7 zu erkennen.



Abbildung 7: 12% Tris-Trizin-Gel der Aufreinigung von 14-3-3η VL über eine Ni-NTA-Sepharose Säule.

Spur 1: 5 μ L des Markers *Prestained Protein Ladder* (Fermentas), Spur 2: Probe des Pellets (20 μ g), Spur 3: Probe des Überstandes (20 μ g), Spur 4: Probe des Durchflusses nach Beladen der Säule (20 μ g), Spur 5: Probe des Eluat 1 (20 μ g), Spur 6: Probe des Eluat 2 (20 μ g), Spur 7: Probe des Eluat 3 (0,41 μ g), Spur 8: Probe des Eluat 4 (0,25 μ g).

Auf dem Gel wurden die verschiedenen Fraktionen der Aufreinigung aufgetragen. Inder Spur, auf der die Pelletprobe aufgetragen wurde, ist eine starke Bande zwischen 35 und 40 kDa zu sehen. Zudem ist oberhalb von 40 kDa eine etwas stärkere Bande zu beobachten, welche auch in den Proben des Überstandes und des Durchflusses vorhanden sind. Bei allen drei Auftragungen ist zu erkennen, dass auf der Höhe von etwa 40 kDa die Bahn verengt wird. Dies könnte auf eine Unebenheit des Geles zurückzuführen sein. Demnach ist die Bande, welche vermutlich das gesuchte Protein aufweist, etwas unterhalb bei 35 kDa. Es ist deutlich zu beobachten, das diese Bande im Überstand stärker ausgeprägt ist als im Durchfluss. Demzufolge wurde der Großteil des Proteins auf die Säule übertragen. In den Proben der Eluate 1 und 2 ist jeweils eine sehr breite Bande bei ca. 30 kDa zu sehen. Die Breite dieser Bande erklärt sich durch eine hohe aufgetragene Konzentration. Auf den Bahnen 7 und 8 ist diese Bande klarer zu erkennen. Hier wurden nur 4,1 bzw. 2,5 µg des Proteins aufgetragen, anstelle von 20 µg wie bei den Proben der Eluate 1 und 2. Auf den Bahnen der Eluate sind schwache Abbaubanden 7U erkennen. Demnach ist die Aufreinigung mit leichten Verunreinigungen behaftet gewesen.

Die vier Eluate wurden vereinigt und konzentriert. Letztendlich wurden etwa 1,5 mL des Proteins 14-3-3η mit einer Konzentration von 51,8 mg/mL erhalten.

5.1.2 Expression und Aufreinigung von GST

Für den Oberflächenassay wurde das Protein Glutathion-S-Transferase (GST) exprimiert und aufgereinigt. Demnach wurde zunächst eine Plasmidtransformation des pGEX4T1i-Vektors in Rosetta-DE3-Zellen durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Exprimierung in TB-Medium gemäß Abschnitt 4.2.1 und die Aufreinigung nach Protokoll in Kap. 4.3.2.2. In der folgenden Abbildung ist das Gelbild der Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie über eine GSH-Sepharose-Säule dargestellt.



Abbildung 8: 12% Tris-Trizin-Gel der Aufreinigung von GST über eine GSH-Sepharose-Säule. Spur 1: 5µL Marker *Prestained Protein Ladder* (Fermentas), Bahn 2: Spur nach der Dialyse, Bahn 3: Spur der Waschfraktion, Spur 4: Probe des Durchflusses beim Beladen der Säule, Spur 5: Probe des Überstandes, Spur 6:Probe des Pellets, Spur 7: Probe des Lysats. Die Proben auf den Spuren 3-7 wurden 1:10 und die Probe des Dialysats (Spur 2) 1:1 verdünnt.

Auf dem Gelbild ist zu erkennen, dass das gesuchte Protein, welches 27,9 kDa groß ist, im Lysat vorhanden ist. Es ist eine ausgeprägte Bande knapp über 25 kDa zu sehen. Im Pellet ist diese Bande ebenfalls zu erkennen, jedoch ist sie nicht so stark ausgeprägt wie in der Probe des Lysats. Demzufolge ist noch GST im Pellet vorhanden ist. Nach dem Zellaufschluss ist im Überstand auch eine deutliche Bande bei der gesuchten Größe von 27 kDa zu beobachten. Dies trifft jedoch auch auf die Probe des Durchflusses zu. Es ist zudem deutlich zu erkennen, dass nach dem Waschschritt kaum Protein von der Säule gewaschen wurde. In der Probe nach der Dialyse ist wiederum eine dicke Bande bei etwa 27 kDa zu sehen. Es konnte nicht die gesamte Menge an GST aus dem Pellet gelöst werden. Zudem ist in dem Durchfluss nach Beladen der Säule das gesuchte Protein vorhanden. Dies lässt vermuten, dass nicht alles GST an die Matrix der Säule gebunden hat.

Bei den Proben der Spuren 4-7 sind zudem viele weitere Bande vorhanden, welche bei der Probe des Dialysats (Spur 2) nicht mehr zu sehen sind. Demnach ist in dem erhaltenen Dialysat das reine Protein GST vorhanden. Die ermittelte Konzentration des GST betrug 1,85 mg/mL bei etwa 1,5 mL.

5.1.3 Aufreinigung von Tau

Das Phosphomimikry Tau₂₀₇₋₃₂₈S214A,S324A wurde für weitere Bindungsstudien mit SPR (*Surface Plasmon Resonance*) aufgereinigt. Diese Versuche konnten jedoch aus zeitlichen Gründen nicht mehr im Verlauf dieser Arbeit durchgeführt werden.

Intein-Tau₂₀₇₋₃₂₈S214A,S324A wurde bereits zuvor exprimiert und das Pellet bei -20 °C gelagert. Demnach erfolgten der Zellaufschluss und anschließend die Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie. Für die Aufreinigung mit einem Intein-fusionierten Peptid wurde die Chitin-Säule verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß Abschnitt 4.2.3.3.

Bevor der Überstand auf die Säule aufgetragen wurde, erfolgte eine Überprüfung mittels SDS-Gelelektrophorese, ob das gesuchte Peptid aus dem Pellet gelöst werden konnte.



Abbildung 9: 15 % Tris-Trizin-Gel nach Zellaufschluss von Tau₂₀₇₋₃₂₈S214A,S324A. Spur 1: Probe des Zelllysats vor Zellaufschluss, Spur 2: Probe des Zelllysats nach Zellaufschluss, Spur 3: Probe des Überstandes nach Zellaufschluss und Zentrifugation, Spur 4:, Probe des Pellets nach Zellaufschluss und Zentrifugation, Spur 5: 4µL Marker *Prestained Protein Ladder* (Fermentas). Auf den Spuren 1-4 wurden je 10 µL Probe (1:10 verdünnt) aufgetragen.

Bei allen aufgetragenen Proben sind Banden zwischen 55 und 70 kDa zu beobachten. Auf der Spur 1 wurde das Zelllysat vor Zellaufschluss aufgetragen. Hier sind die Banden schwächer abgebildet. Nach Zellaufschluss (Spur 2) sind diese Banden verstärkt zu sehen. Demnach wurde das Fusionsprotein erfolgreich aus den Zellen isoliert. Nach anschließender Zentrifugation wurden Proben des Überstandes und des Pellets aufgetragen. Die Banden um 60 kDa sind deutlich stärker im Überstand als im Pellet zu sehen. Anhand dieses Gelbildes ist zu erkennen, dass das gesuchte Fusionsprotein sich im aufgetragenen Überstand befand, jedoch auch etwas Protein im Pellet zurückblieb.

Bei der anschließenden Affinitätschromatographie wurden die einzelnen Fraktionen ebenfalls mit Hilfe der Gelelektrophorese überprüft.



Abbildung 10: 15 % Tris-Trizin-Gel der Aufreinigung von Tau₂₀₇₋₃₂₈S214A,S324A über eine Chitin-Säule.

Spur 1: 2 µL Marker *Prestained Protein Ladder* (Fermentas), Spur 2: Probe des Lysats, Spur 3: Probe des Überstandes, Spur 4: Probe des Durchflusses nach Beladen der Säule, Spur 5: Probe der Waschfraktion, Spur 6: Probe des Eluat ohne BME, Spur 7: Probe des Eluats mit BME, Spur 8-12: Proben der Eluatfraktionen 1-5, Spur 13: Probe der gesammelten Eluate, Spur 14: Probe des Dialysats, Spur 15: Probe des Durchflusses beim Aufkonzentrieren. Die Proben auf den Spuren 2-5 wurden 1:10 verdünnt, während die Proben auf den Spuren 6-15 1:1 verdünnt wurden.

Das gesuchte Fusionsprotein Intein-Tau umfasst ca. 70 kDa. Das Tau-Peptid ist 13,3 kDa groß, während das Intein ca. 56 kDa groß ist. Der Intein-tag befindet sich am N-Terminus des Fusionsproteins, während das Tau-Peptid sich am C-Terminus befindet. In den Proben des Lysats und des Überstandes, sind bei 60-70 kDa je eine stark ausgeprägte Bande zu erkennen. Diese Bande ist in der Probe des Durchflusses (Spur 4) und in der Waschfraktion (Spur 5) nicht mehr zu erkennen. Vielmehr sind diese vier Proben von Zahlreichen Abbaubanden geprägt. Es ist jedoch deutlich zu beobachten, dass bei der gesuchten Größe von 65-70 kDa die Intensität der Banden abnimmt. Demzufolge konnte das Fusionsprotein erfolgreich auf die Säule beladen werden und es wurde wenig von diesem ausgewaschen. In den zwei folgenden Spur 6 und 7 sind die Proben der Elutionsschritte mit Cleavage-Puffer mit und ohne BME dargestellt. In Spur 6 ist bei 65-70 kDa eine schwache Bande auszumachen. Hier wurde möglicherweise eine geringe Menge des Fusionsproteins ausgewaschen. Bei der Probe 7 wurde mit Puffer gespült, welcher BME enthält. Dieses Detergenz bewirkt die Initiierung des Splicens des Intein-*tags* und somit die Abspaltung des Tau von der Säule. Eine schwache Bande bei 60 kDa könnte demzufolge das abgespaltene Intein sein. Die Spuren 8-13 umfassen die Eluate der eigentlichen Elution nach einer Ruhezeit der Säule von etwa 16 Stunden. Bei allen Spuren ist eine schwache Bande bei etwa 70 kDa zu beobachten. Dies könnte eine geringe Menge des Fusionsproteins sein, welches den Prozess des Splicen nicht vollzogen hat.

Alle Spuren der Eluate weisen vier bis fünf Banden zwischen 10 und 15 kDa auf. Die Banden bei ca. 14 kDa könnten demnach das gesuchte Protein wiedergeben. Die Banden unterhalb von 14 kDa sind als Abbaubanden von Tau zu erklären. Auf Spur 14 wurde das Dialysat aufgetragen, welches aus dem zusammengelegten und aufkonzentrierten Eluaten besteht. Die Intensität der Banden nimmt hier stark zu. Auf der letzten Spur ist die Probe des Durchflusses beim Aufkonzentrieren zu sehen. Es sind noch sehr schwache Banden zu erkennen. Demzufolge ist eine geringe Menge an Tau beim Aufkonzentrieren verloren gegangen. Die Konzentration des Tau-Peptids betrug nach der Dialyse 0,53 mg/mL.

Um zu überprüfen ob die Banden bei den Proben der Eluate das Peptid Intein-Tau₂₀₇₋ ₃₂₈S214A,S324A darstellen, wurde ein Western Blot durchgeführt.

5.1.4 Western-Blot

Die Aufreinigung des Peptids Tau₂₀₇₋₃₂₈S214A,S324A wurde mit Hilfe des Western Blots überprüft. Der Western-Blot wurde zunächst mit einem Antikörper spezifisch für Tau durchgeführt. Des Weiteren erfolgte ein Western-Blot mit einem Antikörper gegen Intein. Die Durchführung erfolgte gemäß dem Protokoll in Abschnitt 4.2.8.

Auf der folgenden Abbildung ist die Cellulose-Membran des Western Blots nach Anfärben mit BCIP/NBT dargestellt.



Sehr schwache Banden bei ca. 70 kDa auf den Spuren 9-13.

Abbildung 11: Membran des Western Blots mit Anti-Tau Antikörper und Anti-Mouse IgG, APlinked nach Anfärben mit BCIP/NBT.

Spur 1: 2 µL Marker *Prestained Protein Ladder* (Fermentas), Spur 2: Probe des Lysats, Spur 3: Probe des Überstandes, Spur 4: Probe des Durchflusses nach Beladen der Säule, Spur 5: Probe der Waschfraktion, Spur 6: Probe des Eluat ohne BME, Spur 7: Probe des Eluats mit BME, Spur 8-12: Proben der Eluatfraktionen 1-5, Spur 13: Probe der gesammelten Eluate, Spur 14: Probe des Dialysats. Die Proben auf den Spuren 2-5 wurden 1:10 verdünnt, während die Proben auf den Spuren 6-14 1:1 verdünnt wurden.

Bei den Proben des Lysats, Überstandes, Durchflusses und der Waschfraktion (Spur 2-5) sind mehrere Banden zu erkennen. Die ausgeprägteste Bande liegt bei ca. 55 kDa. Zudem sind weitere Banden bei knapp 40 kDa zu beobachten. Auf den Spuren der aufgetragenen Eluate ist kaum etwas zu erkennen. Jedoch sind bei den Spuren 9-13 sehr schwach eine Bande bei je 70 kDa zu sehen. Für eine bessere Übersicht wurde der Bereich auf der Abbildung 11 markiert.

Die Banden bei 55 kDa bei den ersten Proben sind ungewöhnlich. Das Fusionsprotein wäre bei 65-70 kDa zu erwarten gewesen. Die Bindestelle des Antikörpers an Tau ist nicht genau bekannt. Es könnte demnach sein, dass der Antikörper an eine Sequenz bindet, welche nah am Intein liegt. Demzufolge können die Bande zwischen 55 und 70 kDa das Fusionsprotein mit C-terminal abgebautem Tau-Peptid darstellen. Jedoch erklärt dies nicht die Banden zwischen 40 und 55 kDa, da trotz abgebautem Tau-Peptid das Fusionsprotein nicht kleiner als das reine Intein (ca. 56 kDa) sein kann. Zudem sind die Banden oberhalb von 70 kDa auf den Bahnen 2-5 sehr ungewöhnlich. Da der Antikörper an Tau bindet, und das Fusionsprotein von Intein und Tau nicht größer als 73 kDa ist, kann in dieser Größe kein Tau vorliegen. Auf dem Gelbild in Abbildung 4 ist zu erkennen, dass sich Makromoleküle zwischen 70 und 130 kDa in den Proben der Spuren 2-5 befinden. Die Banden auf der Membran des Western Blots könnten also durch unspezifische Bindung des Antikörpers zustande gekommen sein. Dies würde auch die Banden bei den Proben der Eluate 9-13 und die Banden unterhalb von 55 kDa auf den Spuren 2-5 erklären.

Bei den Proben der Eluate müsste nach erfolgreicher Aufreinigung eine Bande bei ca. 14 kDa zu sehen sein. Auf der Cellulose-Membran ist hier jedoch nichts zu beobachten. Leider ist in diesem Bereich ein größerer Fleck auf der Membran, welcher durch Verschmutzungen verursacht wurde. Dadurch könnten etwaige Banden überdeckt worden sein.

Da mit Hilfe des Western Blot keine eindeutige Aussage über die Aufreinigung des Peptids Tau getroffen werden konnte, wurde ein zweiter Western Blot durchgeführt. Bei diesem wurde ein Antikörper spezifisch für Intein eingesetzt (Anti-CBD). Die Durchführung erfolgte analog und es wurde folgendes Bild der angefärbten Membran erhalten.

2 3 5 7 9 10 11 12 13 14 1 Δ 6 8 130 kDa 70 kDa 55 kDa 40 kDa 35 kDa 25 kDa 15 kDa 🔛 10 kDa

Abbildung 12: Membran des Western Blots mit Anti-CBD und Anti-Mouse IgG, AP-linked nach Anfärben mit BCIP/NBT.

Spur 1: 2 µL Marker *Prestained Protein Ladder* (Fermentas), Spur 2: Probe des Lysats, Spur 3: Probe des Überstandes, Spur 4: Probe des Durchflusses nach Beladen der Säule, Spur 5: Probe der Waschfraktion, Spur 6: Probe des Eluat ohne BME, Spur 7: Probe des Eluats mit BME, Spur 8-12: Proben der Eluatfraktionen 1-5, Spur 13: Probe der gesammelten Eluate, Spur 14: Probe des Dialysats. Die Proben auf den Spuren 2-5 wurden 1:10 verdünnt, während die Proben auf den Spuren 6-14 1:1 verdünnt wurden.

Bei den Proben des Lysats und des Überstandes sind ausgeprägte Banden zwischen 55 und 70 kDa zu sehen. Möglicherweise zeigen die Banden Fusionsproteine von Intein mit je unterschiedlich stark abgebautem Tau-Peptid. Auf den Spuren 7 und 8 sind bei 55 kDa Banden zu sehen. Auf Spur 7 wurde eine Probe des Durchflusses nach Waschen mit BME-haltigem Puffer aufgetragen. Es könnte demnach sein, dass sich Intein nach dem Splicen von der Säulenmembran gelöst hat und ausgewaschen wurde. Demzufolge befindet sich in der Probe des Eluats 1 (Spur 8) auch noch freies Intein.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass der Western Blot mit dem Antikörper Anti-Tau unspezifische Ergebnisse darstellt. Möglicherweise wurden unspezifische Bindestellen nicht erfolgreich durch BSA gesättigt. Zudem war der Antikörper nicht frisch, während der Anti-CBD Antikörper neu eingesetzt wurde.

Anhand des Western Blots mit dem Anti-CBD Antikörper konnte das Intein in dem Fusionsprotein und in freier Form nachgewiesen werden. Durch die Ausführung des Western Blots konnte dennoch keine eindeutige Aussage über die Aufreinigung des Tau-Peptids getroffen werden.

5.2 Wechselwirkung Tau mit 14-3-3 Proteinen

Die Untersuchung der Wechselwirkung des Tau-Peptids FAM-Tau₂₁₁₋₂₁₈(GGS)₃₋₃₁₉₋₃₃₁pS214,pS324 (FAM-Tau-Tether) mit den 14-3-3 Proteinen umfasst zunächst eine Messung der Spezifität der 14-3-3 Isoformen. Diese wurde an dem doppelphosphorylierten Peptid sowie an den einzelphosphorylierten Peptiden FAM-Tau₂₁₀₋₂₁₈pS214 und FAM-Tau₃₂₀₋₃₂₈pS324 durchgeführt. Letzteres soll Auskunft darüber geben, ob beide Bindungsstellen des Tau-Peptids gleichermaßen an der Ausbildung der Wechselwirkung beteiligt sind.

Des Weiteren wurde die Beeinflussung der Wechselwirkung des Tau-14-3-3 Komplexes durch kleine Moleküle, bzw. Wirkstoffe, getestet. Durch die Stabilisierung oder Inhibierung solcher Komplexe können eingeleitete Wege oder Signale, die von der Wechselwirkung ausgelöst werden, gesteuert werden. Dieser Aspekt ist hinsichtlich der Relevanz von Tau in der Ausbildung neurodegenerativer Krankheiten ein interessantes Themengebiet.

5.2.1 Isoformspezifität

Zunächst wurde eine Isoformspezifitätsmessung der 14-3-3 Proteine mit FAM-Tau-Tether durchgeführt. Für die Messung wurde der Fluoreszenz-Polarisations-Assay gewählt, da dies eine schnelle und exakte Methode ist, bei der verglichen mit anderen Methoden wenig Material verwendet wird. Die Durchführung erfolgte gemäß Abschnitt 4.3.1. Um die Ergebnisse zu validieren, wurde der Bindungsassay insgesamt drei Mal pro Isoform durchgeführt. Zudem wurde als dreifach Bestimmung gemessen. Mit Hilfe des Programmes Graph Pad Prism wurden die erhaltenen Daten ausgewertet und die Anisotropie wurde gegen die Konzentration der 14-3-3 Isoformen aufgetragen. Da bei den erhaltenen Messdaten nur geringfügige Abweichungen der drei Versuche bestehen, wird in der folgenden Abbildung 13 nur ein Versuch exemplarisch präsentiert.



Abbildung 13: Auftragung der normalisierten Signale gegen die 14-3-3 Konzentration. **A)** Isoformspezifitätsmessung mit den 14-3-3 Isoformen γ (5,99 mg/mL), η (8,15 mg/mL) und τ (4,34 mg/mL), **B)** Isoformspezifitätsmessung mit den 14-3-3 Isoformen β (6,67 mg/mL), σ (4,87 mg/mL), ϵ (2,82 mg/mL) und ζ (4,80 mg/mL). Die FAM-Tau-Tether-Konzentration betrug in A) + B) 20 nM. Die Konzentrationsangaben der 14-3-3 Isoformen spiegelt die maximal titrierte Konzentration wieder.

In der Abbildung 13 ist die direkte Bindung der 14-3-3 Isoformen an das FAM-Tau-Tether Peptid dargestellt. Da nicht mit gleicher Konzentration der 14-3-3 Isoformen gemessen wurde, sind die dargestellten Graphen unterschiedlich lang. Um das Bindungsverhalten der Isoformen untereinander besser vergleichen zu können, wurden die erhaltenen Signale auf einen gemeinsamen Höchstwert normalisiert. Um eine geeignete Bindungskonstante aufzustellen, ist es von Vorteil, wenn der Anstieg der gemessenen Anisotropie mindestens 60 Einheiten beträgt. Bei der schwächsten Bindung (14-3-3 σ) betrug der Anstieg nur ca. 30, während bei beispielsweise η ein Anstieg um 90 Einheiten erreicht wurde. Aus der Abbildung 13 ist demnach zu entnehmen, dass die 14-3-3 Isoform σ deutlich schwächer an Tau-Tether bindet als die anderen Isoformen. Bei γ , η , τ und auch β ist die Ausbildung einer Sättigung zu beobachten. Dies bedeutet, dass die Konzentration von 14-3-3 Proteinen erreicht ist, um ein Gleichgewicht zwischen ungebundenen 14-3-3 Proteinen und gebundenen 14-3-3 Proteinen an das Peptid einzustellen. Diesen Zustand beschreibt die Dissoziationskonstante K_D.

Aus den erhaltenen Daten konnte gemäß der Formel (5) in Kap. 4.3.1 ein K_D-Wert pro Isoform berechnet werden. In der folgenden Tabelle 19 sind die gemittelten K_D-Werte sowie die Standardabweichung wiedergegeben.

Tabelle 19: Die erhaltenen K_D-Werte der Isoformspezifitätsmessung der 14-3-3 Proteine mit FAM-Tau-Tether

K _D [μM]	gamma	eta	tau	beta	sigma	epsilon	zeta
Mittelwert	1,233	3,685	4,911	4,533	102,7	10,17	3,482
Standard Abweichung	0,4586	0,3512	2,596	0,5327	54,56	1,74	2,097

Anhand der erhaltenen Werte bestätigt sich die Annahme, dass 14-3-3 σ die schwächste Affinität zu Tau aufweist. Der K_D-Wert liegt bei 103±55 µM. Auch die Isoform ε ist um das 10-fache schwächer als die restlichen Isoformen. Diese weisen mit K_D-Werten zwischen 1,2±0,5 und 4,9±2,6 µM eine gute Affinität gegenüber Tau-Tether auf. Es ist jedoch zu beachten, dass die Standardabweichung der Isoformen τ und ζ einen hohen Wert einnimmt. Demnach gab es bei den Messungen dieser Isoformen größere Schwankungen der erhaltenen Werte. Demzufolge zeigten die 14-3-3 Isoformen η und γ bei der Isoformspezifitätsmessung die besten Affinitäten gegenüber FAM-Tau-Tether.

Mit Hilfe des Fluoreszenz-Polarisations-Assays konnte gezeigt werden, dass nicht alle 14-3-3 Isoformen gleich affin gegenüber FAM-Tau-Tether sind. Wie zuvor in Kap. 1.1.1 beschrieben, ist die Struktur in den amphipatischen Bindetaschen der 14-3-3 Proteine zwischen den einzelnen Isoformen sehr ähnlich (Aitken, 2006). Demnach lässt sich annehmen, dass die unterschiedlichen Affinitäten durch Unterschiede in der Aminosäuresequenz an der Protein-Oberfläche hervorgerufen werden.

5.2.1.1 Isoformspezifitätsmessung der einzelphosphorylierten Tau-Peptide Zusätzlich zu der Messung mit dem FAM-Tau-Tether-Peptid wurde die Messung mit den einzelphosphorylierten Tau-Peptiden FAM-Tau₂₁₀₋₂₁₈pS214 und FAM-Tau₃₂₀₋₃₂₈pS324 durchgeführt. Es wurde wiederum eine dreifach Bestimmung gemessen. In der Abbildung 14 sind die Ergebnisse der beiden Tau-Peptide mit allen 14-3-3 Isoformen graphisch dargestellt.



Abbildung 14: Die Kurven der Isoformspezifitätsmessung von FAM-Tau₂₁₀₋₂₁₈pS214 und FAM-Tau₃₂₀₋₃₂₈pS324 mit den 14-3-3 Isoformen. Auftragung der gemessenen Anisotropie gegen die 14-3-3 Konzentration.

A) Ergebnisse der Messung mit FAM-Tau₂₁₀₋₂₁₈pS214 und den 14-3-3 Isoformen γ (5,99 mg/mL), η (8,15 mg/mL) und τ (4,34 mg/mL), **B)** Isoformspezifitätsmessung mit FAM-Tau₂₁₀₋₂₁₈pS214 und den 14-3-3 Isoformen β (6,67 mg/mL), σ (4,87 mg/mL), ε (2,82 mg/mL) und ζ (4,80 mg/mL). Die FAM-Tau₂₁₀₋₂₁₈pS214-Konzentration betrug in A) + B) 20 nM. **C)** Ergebnisse der Messung mit FAM-Tau₃₂₀₋₃₂₈pS324 und den 14-3-3 Isoformen γ (5,99 mg/mL), η (8,15 mg/mL) und τ (4,34 mg/mL), **D)** Isoformspezifitätsmessung mit FAM-Tau₃₂₀₋₃₂₈pS324 und den 14-3-3 Isoformen β (6,67 mg/mL), σ (4,87 mg/mL), ε (2,82 mg/mL) und ζ (4,80 mg/mL). Die FAM-Tau₃₂₀₋₃₂₈pS324-Konzentration betrug in C) + D) 20 nM. Die Konzentrationsangaben der 14-3-3 Isoformen gibt die maximal titrierte Konzentration an. Mit den erhaltenen Signalen wurden keine weiteren Analysen durchgeführt, da die Messdaten eine zu geringe Differenz der Anisotropieeinheiten aufweisen. Der Anstieg der gemessenen Anisotropie bei FAM-Tau₂₁₀₋₂₁₈pS214 ist sehr gering. Lediglich die Isoformen η , β und γ weisen einen Anstieg von etwa 60-70 Anisotropieeinheiten auf. Bei den anderen Isoformen wurde kein Anstieg höher als 20 Einheiten gemessen. Bei den Messungen mit FAM-Tau₃₂₀₋₃₂₈pS324 ergaben sich weitaus geringere Werte. Hier wird bei keiner Isoform ein Anstieg des Signals um 20 Einheiten beobachtet. Demnach konnte aus den Messungen keine Bindungskonstante berechnet werden, da die gemessenen Signalwerte zu schwach waren. Im Verlauf der Kurven ist demzufolge deutlich zu beobachten, dass die 14-3-3 Isoformen eine sehr geringe Affinität gegenüber dem FAM-Tau₂₁₀₋₂₁₈pS214 und FAM-Tau₃₂₀₋₃₂₈pS324 aufweisen. Bei keiner Isoform ist eine Ausbildung der Sättigung zu beobachten.

Anhand der Abbildung 14 ist jedoch zu erkennen, dass die 14-3-3 Isoformen unterschiedlich affin gegenüber den verschiedenen einzelphosphorylierten Tau-Peptiden sind. Die 14-3-3 Isoformen binden etwas stärker an FAM-Tau₂₁₀₋₂₁₈pS214 als an FAM-Tau₃₂₀₋₃₂₈pS324. Die Tendenzen zwischen den Isoformen sind jedoch bei beiden Bindungsstellen gleich. Die Isoformen β , γ und η weisen eine höhere Affinität gegenüber Tau auf, als ε , σ und τ . Diese Erkenntnis bestätigt die Isoformspezifität der Messung mit FAM-Tau-Tether (siehe Kap. 5.2.1).

Bei den Ergebnissen dieser Messungen ist deutlich zu sehen, dass die einzelphosphorylierten FAM-Tau-Peptide eine sehr geringe Affinität gegenüber den 14-3-3 Proteine im Vergleich zu dem doppelphosphorylierten FAM-Tau-Peptid aufweisen. Demzufolge wurde die Beeinflussung der Wechselwirkung zwischen den Einzel-Tau-Peptiden und 14-3-3-Proteinen durch Wirkstoffe nicht weiter mit der Methode der Fluoreszenz-Polarisation untersucht, da diese hierfür nicht geeignet ist.

Letztendlich kann gesagt werden, dass die Wechselwirkung des 14-3-3 Proteins mit dem FAM-Tau-Tether Peptid von beiden Bindungsstellen des Peptids abhängt. Es gibt Unterschiede im Bindungsverhalten der beiden Bindungsstellen, jedoch ist die Wechselwirkung zu schwach, als dass sie sich mit dem bestehenden Fluoreszenz-Polarisationsassay vollständig charakterisieren lässt.

5.2.2 Stabilisierung

Die Stabilisierung der 14-3-3-Tau-Wechselwirkung wurde mit der 14-3-3 Isoform η gemessen. Es wurden FAM-Tau₂₁₁₋₂₁₈(GGS)₃₋₃₁₉₋₃₃₁pS214,pS324 (FAM-Tau-Tether) 20 nm und 14-3-3 η mit einer Konzentration von 0,5 M vorgelegt und die verschiedenen Stabilisatoren dazu titriert. Es wurden die Stabilisatoren FC-A (10 mM), 16-*O*-Me-FC-H (10 mM) und ISIR-005 (20 mM) getestet (siehe Abb. 4). Im Vergleich mit 16-*O*-Me-FC-H und ISIR-005 war die Wirkung von FC-A jedoch deutlich schwächer. Die EC₅₀-Werte von FC-A waren um 10³ größer. Demnach wurde die Validierung der Stabilisierung nur mit den Wirkstoffen 16-*O*-Me-FC-H und ISIR-005 durchgeführt.



Abbildung 15: Logarithmische Auftragung der erhaltenen Daten gegen die Konzentration der titrierten Compounds (Stabilisatoren) 16-*O*-Me-FC-H (maximal titrierte Konzentration 10 mM) und ISIR-005 (maximal titrierte Konzentration 20 mM).Die Konzentration von FAM-Tau-Tether betrug 20 nM und von 14-3-3 eta 0,5 µM. DMSO dient als Negativkontrolle.

Der Kurvenverlauf von 16-*O*-Me-FC-H und ISIR-005 in Abbildung 15 ist sigmoidal und gibt den Ansatz einer Sättigung wieder. Dies bedeutet, dass an diesem Punkt die maximale Konzentration des Stabilisators erreicht ist, welche einen Einfluss auf die Bindung hat. DMSO diente als Negativkontrolle. Der leichte Anstieg des Graphens ist durch den Lösungsmitteleffekt von DMSO zu erklären. Um die beiden Stabilisatoren zu vergleichen, wurde zudem der EC_{50} -Wert nach der Formel (6) in Kap. 4.3.1 berechnet. Dieser Wert spiegelt die Konzentration wieder, bei der 50 % des 14-3-3 η -Tau-Komplexes stabilisiert wird.

Tabelle 20: Die erhaltenen EC₅₀-Werte der Messung von FAM-Tau-Tether₂₀₇₋₃₂₈pS214,pS324 mit 14-3-3η und den Stabilisatoren 16-*O*-Me-FC-H und ISIR-005. DMSO diente als Negativkontrolle.

EC ₅₀ [M]	16- <i>0</i> -Ме-FC-Н	ISIR-005	DMSO / Negativkontrolle
Mittelwert	6,2·10 ⁻⁵	8,8·10 ⁻⁵	0,00191
Standard- abweichung	8,3.10-6	1,3·10 ⁻⁵	0,00053

Die EC₅₀-Werte der beiden Wirkstoffe liegen nah beieinander. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die beiden Stabilisatoren sehr ähnliche Strukturen besitzen. Jedoch sind beide Strukturen Derivate des FC-A. Die deutlich geringere Wirkung des FC-A liegt demnach möglicherweise an den zusätzlichen Seitenketten am C₁₂-Atom.

Insgesamt ist zu erkennen, dass der 14-3-3 η -Tau komplex durch die getesteten Wirkstoffe stabilisiert werden kann. Die EC₅₀-Werte liegen jedoch im zweistelligen µmolaren Bereich. Demnach ist die Wirkung der Stabilisierung durch 16-*O*-Me-FC-H und ISIR-005 auf den 14-3-3 η -Tau-Komplex relativ gering. Dies hat zur Folge, dass eine hohe Konzentration der Stabilisatoren eingesetzt werden muss, um eine optimale Wirkung zu erhalten.

5.2.3 Inhibierung

Desweiteren wurde der Effekt von Inhibitoren auf den FAM-Tau-Tether-14-3-3-Komplex getestet. Die Messung wurde wie zuvor drei Mal als dreifach Bestimmung durchgeführt. Die Konzentration von 14-3-3η betrug hierbei 16 µM. Die eingesetzten Inhibitoren PTLR-1 und PTLR-2 (Eigenname) zeigten bereits eine gute Wirkung bei der Beeinflussung der Wechselwirkung zwischen 14-3-3 Proteinen und Peptiden. Da diese Wirkstoffe aus einer bislang nicht veröffentlichten Arbeit stammen, wird nicht weiter auf die Struktur und Herkunft der Inhibitoren eingegangen.



Abbildung 16: Logarithmische Auftragung der erhaltenen Daten gegen die Konzentration der titrierten Compounds (Inhibitoren) PTLR-1 (maximal titrierte Konzentration 10 mM) und PTLR-2 (maximal titrierte Konzentration 10 mM). Die Konzentration von FAM-Tau-Tether betrug 20 nM und von 14-3-3η 16 μM.

Aus der Abbildung ist zu entnehmen, dass die Wechselwirkung zwischen dem Tau-Peptid und dem 14-3-3-Protein abnimmt und demzufolge durch die Inhibitoren gehemmt wird. Der in rot markierte Inhibitor PTLR-1 zeigt hierbei eine wesentlich stärkere Wirkung als der in schwarz wiedergegebene PTLR-2-Inhibitor. Dennoch erreicht die Kurve des PTLR-1 keine Sättigung. Diese würde möglicherweise nur bei einer höheren Konzentration als 10 mM erreicht werden. Für die Auswertung der beiden Inhibitoren wurde der IC₅₀-Wert nach Formel (5) aus Kap. 4.3.1 berechnet. Dieser gibt die Konzentration wieder, bei welcher 50 % der Wechselwirkung zwischen Tau und 14-3-3 inhibiert vorliegt. Die Werte sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 21: IC ₅₀ -Werte der Messung von FAM-Tau-Tether mit 1	14-3-3η und den Inhibitoren
PTLR-1 und PTLR-2.	

IC ₅₀ [M]	PTLR-1	PTLR-2
Mittelwert	0,31·10 ⁻³	1,99·10 ⁻³
Standard- abweichung	0,13.10-3	0,5.10-3

Die IC₅₀-Werte der zwei Wirkstoffe liegen im mmolaren Bereich und besitzen beide eine hohe Standardabweichung. Demnach ist die Wirkung der getesteten Inhibitoren auf die Wechselwirkung des 14-3-3 η -FAM-Tau-Tether Komplexes relativ schwach. Die Inhibitoren besitzen zudem eine schwächere Wirkung im Vergleich mit den getesteten Stabilisatoren. Dennoch ist der Ansatz einer inhibierenden Wirkung zu erkennen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Beeinflussung der Wechselwirkung zwischen FAM-Tau-Tether und 14-3-3η durch die im Rahmen dieser Arbeit getesteten Inhibitoren sowie Stabilisatoren hervorgerufen wird. Diese Wirkung jedoch zu schwach ist, um bei Einsatz einer geringen Konzentration der Compounds den gewünschten Effekt auf die Wechselwirkung zu erhalten. Demzufolge müssten weitere Screens durchgeführt werden, um möglicherweise Derivate dieser Wirkstoffe oder gänzlich neue Wirkstoffe zu finden, welche einen stärkeren Einfluss auf die zu untersuchende Wechselwirkung besitzen.

5.3 Untersuchung des Bindungsverhalten von Tau an 14-3-3 Proteine

In diesem Teil der Arbeit wurde der Mechanismus der Bindung von Tau an 14-3-3 über die Bindestellen S214 und S324 untersucht. Zunächst wurden Tau-Mutanten erzeugt, welche anstelle der Aminosäure Serin an Position 214 und 324 ein Alanin oder Aspartat aufweisen. Anschließend wurde ein Oberflächenassay mit 14-3-3ŋ durchgeführt. Bei der Messung wurden positiv und negativ Kontrollen mit berücksichtigt. Für diesen Zweck wurde das Protein GST aufgereinigt.

5.3.1 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerichtete Mutagenese wurde angewendet, um die zwei Aminosäuren von Tau₂₀₇₋₃₂₈, welche signifikant für die phosphorylierungsabhängige Bindung mit 14-3-3 Proteinen sind, zu mutieren. Es wurden Phosphomimikry hergestellt, die anstelle des Serin 214 ein Aspartat und anstatt Serin 324 ein Alanin aufweisen. Der Ansatz der ortsgerichteten Mutagenese wurde mit zwei verschiedenen Plasmiden durchgeführt, welche bereits die Sequenz für Tau₂₀₇₋₃₂₈ mit je einer Mutation besaßen. Es wurde pGEX4T1i-Tau₂₀₇₋₃₂₈S214D (Tau 1) und pGEX4T1i-Tau₂₀₇₋₃₂₈S324A (Tau 2) eingesetzt. Die spezifischen Primer sind der Tabelle 9 aus Kap. 3.4.1 zu entnehmen. Anschließend an die PCR wurde ein DpnI-Verdau durchgeführt, wobei die parentale methylierte DNA abgebaut wurde, während die neu amplifizierte mutierte DNA zurückblieb. Darauffolgten eine Plasmidtransformation in *E. coli* XL10-Zellen und die Plasmid-DNA Extraktion. Nachdem eine Sequenzier-PCR und die DNA-Fällung durchgeführt wurde, konnte der Erfolg der ortsgerichteten Mutagenese überprüft werden. In der folgenden Abbildung 17 sind die erhaltenen Sequenzen der mutierten Plasmide dargestellt. Tau original: ------AGHMGSRSRTPSLPTPPTREPKKVAVVRTPP 31 Tau 1 mutiert: KEDDYYGITLSDDSDHQFLLGSQVVVQNAGHMGSRSRTPDLPTPPTREPKKVAVVRTPP 239 Tau 2 mutiert: -----FXXXXXLGSQVVVQNXXXMGSRSRTPDLPTPPTREPKKVAVVRTPP 58 Tau original: KSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGS 91 Tau 1 mutiert: KSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGS 299 Tau 2 mutiert: KSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGS 118 Tau original KDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDLSKVTSKCGSLGNI 126 Tau 1 mutiert: KDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDLSKVTSKCGALGNI 334 Tau 2 mutiert: KDNIKHVPGGGSVXIVYKPVDLSKVTSKCGALGNI 153

Abbildung 17: Alignment der Originalsequenz von Tau₂₀₇₋₃₂₈ und die Sequenz der mutierten Tau-Plasmide Tau 1 und Tau 2. Die signifikanten Aminosäuren und die eingeführten Punktmutationen sind in rot dargestellt.

Die Auswertung der Sequenz wurde mit mehreren Online-Programmen durchgeführt. Mithilfe von BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) wurde überprüft, ob die erhaltene DNA-Sequenz mit der des Tau-Peptids übereinstimmt (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov). Anschließend wurde die DNA-Sequenz in eine Aminosäuresequenz übersetzt. Dies wurde mit dem Programm ExPASy Tools durchgeführt (http://www.expasy.org). Das Alignment der Originalsequenz und der mutierten Aminosäuresequenz wurde mit dem Tool ClustalW2 des Programmes EMBL-EBI erreicht (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2).

Die ortsgerichtete Mutagenese wurde des Öfteren durchgeführt und variiert, da bei dieser Methode mehrere anfällige Schritte aufeinander folgen Es wurden unterschiedliche Elongationszeiten der ortsgerichteten Mutagenese getestet, da nicht alle DNA-Proben nach erfolgreicher Plasmidtransformation eine Mutation aufwiesen. Wurden nach der Plasmidtransformation keine Klone auf den Agar-Platten erhalten, könnte dies auf eine unzureichende Wirkung der Primer zurückgeführt werden. Demnach wurden kaum mutierte Plasmide amplifiziert, weshalb nach dem DpnI-Verdau keine Plasmide zur Plasmidtransformation mehr vorlagen. Des Weiteren könnte eine fehlerhafte Transformation der Plasmide in die Zellen stattgefunden haben.

Dadurch konnten keine Zellen auf dem Agar wachsen, da diese nicht über eine Ampicillinresistenz verfügten.

Letztendlich wurde ein geeignetes Protokoll erstellt (Kapitel 4.1) und es wurden 34,2 ng/µL mutiertes pGEX4T1i-Tau₂₀₇₋₃₂₈S214D,S324A erhalten.

5.3.2 Oberflächenassay

Für die Oberflächenmessung wurden GST-getaggte Proteine benötigt, da diese über das GST die Wells binden. Die an Oberfläche der Messungen zur mit 2 Phosphorylierungsabhängigkeit wurden demnach weiteren Phosphomimikrymutanten durchgeführt, welche zuvor aufgereinigt wurden und einen GST-tag besitzen. Dies waren GST-Tau₂₀₇₋₃₂₈S214D, S324D und GST-Tau₂₀₇₋₃₂₈S214A, S324A und GST-PMA2-CT66 als Positivkontrolle. Die Durchführung des Assays erfolgte nach dem Protokoll in Abschnitt 4.3.2. Bei der Messung wurden zudem die Fluoreszenz-Intensitäten von GFP-14-3-3 mit GST und GST-CT66 bestimmt. GST-CT66 diente als Positivkontrolle und durch Messung des GST konnte die reine Intensität des Proteins ohne 14-3-3 bestimmt werden. Das GFP-markierte 14-3-3 Protein (1 mg/mL) wurde dazu titriert.

Tabelle 22: Pipettierschema des Oberflächenassays mit Tau. Es ist exemplarisch nur eir	ne
Messreihe dargestellt.	

Well	1	2	3	4	5	6	7	8
GFP- 14-3-3 [mg/mL]	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	3,13·10 ⁻²	1,56.10-2	7,8·10 ⁻³
Well	9	10	11	12				
GFP- 14-3-3 [mg/mL]	3,9·10 ⁻³	2·10-₃	ohne GFP- 14-3-3	Blank				

Die erhaltenen Messdaten konnten jedoch nicht ausgewertet werden, da keine Tendenzen der Signale beobachtet werden konnten. Die Signale wiesen starke Schwankungen bei allen Messreihen auf. Als Beispiel dienen die gemessenen Anisotropiewerte der Positivkontrolle GST-PMA2-CT66. Anhand der Tabelle 23 ist zuerkennen, dass die Werte der 12000 und 25000 Anisotropieeinheiten liegen. Bei der Positivkontrolle müssten die erhaltenen Signale aber weitaus stärker ansteigen. Zudem sind die Werte der Kontrollproben des Blanks und der Probe ohne GFP-markiertes 14-3-3 kaum höher als die Werte der Proben mit GFP-14-3-3 Konzentrationen zwischen 2·10⁻³ und 3,13·10⁻² mg/mL (Wells 6-10).

Well	1	2	3	4	5	6	7	8
Mittelwert der Anisotropie werte [mAu]	24558	18979	24760	16454	16292	14243	14537	14713
Well	9	10	11	12				
Mittelwert der Anisotropiewerte [mAu]	14190	14058	13354	12229				

Tabelle 23: Erhaltene Daten der Messung von GST-PMA2-CT66 und GFP-14-3-3

Die gesamten erhaltenen Werte sind im Anhang beigefügt (9.2).

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass die Messmethode des Oberflächenassays sich nicht eignet um Affinitäten verschiedener Phosphomimikry-Bindungspartner zu testen. Diese Methode ist besser geeignet um die Beeinflussung von Wechselwirkungen durch Compounds zu testen. Bei diesem Vorgang werden beide Bindungspartner vorgelegt, was von Vorteil ist. Bei der Methode in dieser Arbeit wurde ein Bindungspartner dazu titriert, was sehr unspezifische Bindungen, beziehungsweise Signale hervorruft.

5.4 Kristallisation

In dieser Arbeit wurde der Komplex 14-3-3-Tau-Tether kristallisiert. Es wurden Komplexlösungen mit den 14-3-3 Δ C TEV Isoformen β , γ , ζ und η und Tau-Tether₂₁₁₋₂₁₈(G)₁₄₋₃₁₉₋₃₂₈pS214,pS324 angesetzt. Der Komplex mit der 14-3-3 Isoform ζ wurde zeitlich früher angesetzt und es konnte ein Kristallwachstum beobachtet werden. Bei den anderen Kristallkomplexen konnte im Verlauf der Arbeit kein ausreichendes Kristallwachstum für röntgenanalytische Analysen beobachtet werden.

Der 14-3-3ζΔC TEV-Tau-Kristall wurde anschließend wie in Abschnitt 4.3.3.2 beschrieben analysiert. Der Datensatz des Protein/Peptidkomplexes wurde unter Synchrotronstrahlung an der Beamline der "Swiss Light Source (SLS)"(Villigen, Schweiz) gesammelt. Die Auflösung betrug 2,8 Å.

Aufgrund der geringen Auflösung der Kristallstruktur konnte das Peptid nicht detailliert in die Bindegruben des 14-3-3 Proteins eingebaut werden. Die Elektronendichte der phosphorylierten Serine war in beiden Bindegruben zwar deutlich zu erkennen, jedoch konnte die zwei Bindestellen des Tau-Peptids mit den erhaltenen Dichtefunktionen nicht definierter unterschieden werden. Demnach wurden zunächst nur die Phosphoserine und je ein N-terminales Glycin als Peptid-Rückgrat eingebaut. Anschließend konnte bei einer Bindestelle ein weiteres Glycin am C-Terminus eingebaut werden.



Abbildung 18: Kristallstruktur des Komplexes 14-3-3ζ-Tau-Tether₂₁₁₋₂₁₈(G)₁₄₋₃₁₉₋₂₃₈ pS214, pS324. Die 14-3-3ξ Monomere sind in hellblau und dunkelblau als Cartoon dargestellt. Die Peptide sind in Stabform dargestellt (grün).



Abbildung 19: Detailansicht der zwei Bindekanäle des 14-3-3ζ-Tau-Tether₂₁₁₋₂₁₈(G)₁₄₋₃₁₉₋₂₃₈ pS214, pS324-Komplexes als Oberflächendarstelllung (grau). A) Das Phosphoserin mit N-terminalem Glycin als Peptid-Rückgrat in Stäbchen-Darstellung (grün), B) Das Phosphoserin mit N- und C-terminalem Glycin als Peptid-Rückgrat in Stäbchen-Darstellung (grün). Die Pfeile in A) und B) weisen auf die Weiterführung des C- bzw. N-Terminus hin.

Die gesamte Sequenz des Tau-Peptids umfasst N-Terminus-RTP{pS}₂₁₄LPTP-(G)₁₄-CG{pS}₃₂₄LGNI-C-Terminus. In der Elektronendichte war dennoch die Ausrichtung der Phosphoserine erkennbar. In Abbildung 19 sind die Phoshoserine mit ein beziehungsweise zwei Glycinen in den 14-3-3ζ Bindegruben dargestellt. Anhand der Dichtefunktionen konnte des Weiteren die Weiterführung der C- bzw. N-Termini des Peptids erahnt werden.



Abbildung 20: Detailansicht der zwei Bindekanäle des 14-3-3ζ-Tau-Tether₂₁₁₋₂₁₈(G)₁₄₋₃₁₉₋₂₃₈ pS214,pS324-Komplexes als Cartoon-Darstellung (blau). A) Das Phosphoserin mit N-terminalem Glycin als Peptid-Rückgrat in Stäbchen-Darstellung (grün). B) Das Phosphoserin mit N- und C-terminalem Glycin als Peptid-Rückgrat in Stäbchen-Darstellung (grün), In A) und B) sind die Aminosäuren Lys49, Arg56, Arg127 und Tyr128 des 14-3-3 Proteins in dunkelblau (A) und hellblau (B) in Stäbchen-Darstellung abgebildet, sowie deren Wechselwirkung mit dem pSer.

Des Weiteren sind die vier Aminosäuren Lysin 49, Arginin 56 und 127 und Tyrosin 128 des 14-3-3 Proteins in der Abbildung 20 dargestellt, welche mit dem phosphorylierten Serin des Peptids wechselwirken. Bei Abb. 20 A) ist zu erkennen, dass die Aminosäure Lysin 49 sich nicht in Reichweite des Phosphoserin befindet, um mit diesem eine Wechselwirkung einzugehen, wie es in Abb. 19 B) dargestellt ist.

Zudem ist aus dem Ramachandran Plot (siehe Abb. 24 Anhang 9.3) zu entnehmen, dass sich mehrere Aminosäuren in nicht erlaubten Bereichen befinden. Für diese Aminosäuren war die Elektronendichte kaum definiert und somit die Anordnung dieser schwer einzuschätzen. Die sogenannten *Outlier* (Ausreißer) wurden zu Alanin mutiert, um die Anzahl der Aminosäuren, welche sich im nicht erlaubten Bereiche befinden, zu verkleinern.

Des Weiteren konnte keine eindeutige Aussage getroffen werden, in welcher Bindegrube sich die jeweiligen Bindestellen des Tau-Peptids befinden. Demzufolge könnte eine Bindestelle, welche affiner gegenüber $14-3-3\zeta$ ist, an beide amphipatischen Bindetaschen gebunden haben. Zur geeigneteren Charakterisierung der Bindung des Tau-Peptids an 14-3-3 Proteine durch Röntgenstrukturanalyse muss zunächst das Kristallwachstum optimiert und anschließend weitere Kristalle analysiert werden.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Im Verlauf dieser Arbeit wurden die sieben humanen 14-3-3 Isoformen hinsichtlich ihrer Affinität gegenüber dem Peptid FAM-Tau-Tether getestet. Es zeigten sich deutliche Unterschiede der Isoformspezifität von Tau. Die 14-3-3 Isoform σ und auch ϵ wiesen eine sehr geringe Affinität auf. Die stärkste Bindung gingen die 14-3-3 Isoformen γ und η mit FAM-Tau-Tether ein. Diese Erkenntnis ist hilfreich für weitere Bindungsstudien des Tau-Peptids mit 14-3-3, da die Beeinflussung solch einer Wechselwirkung am besten getestet werden kann, wenn diese stark vorliegt.

Des Weiteren wurde die Isoformspezifität mit den einzelnen signifikanten Bindestellen der 14-3-3-Protein-Tau Interaktion getestet. Aus dieser Versuchsreihe konnten keine verwertbaren Ergebnisse erhalten werden. Die Affinität von Peptiden der einzelnen Bindestellen alleine reicht entweder nicht aus um eine Wechselwirkung mit den 14-3-3 Proteinen einzugehen, oder ist mit der verwendeten Methode der Fluoreszenz-Polarisation nicht messbar.

Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung der Isoformspezifität mit den einzel phosphorylierten Bindestellen ist die Methode der optisch erzeugten Thermophorese (*Microscale Thermophoresis*). Diese Methode lässt die Messung von schwächer affinen Bindungen zu.

Letztendlich wurde die Beeinflussung der Wechselwirkung zwischen dem doppelphosphorylierten FAM-Tau-Tether 14-3-3 Proteinen und mittels der Fluoreszenz-Polarisation untersucht. Die Versuche wurden mit der 14-3-3 Isoform n durchgeführt. Hinsichtlich des erhaltenen K_D-Wertes und der Standardabweichung erschien diese Isoform am geeignetsten. Die Stabilisierung der Protein-Protein-Interaktion erfolgte durch die Wirkstoffe ISIR-005 und16-O-Me-FC-H. Diese zeigten beide eine ähnliche Wirkung auf die Interaktion. Es konnte gezeigt werden, dass die Wechselwirkung stabilisiert werden konnte, dies jedoch nur in geringen Maßen. Die erhaltenen EC₅₀-Werte im Bereich von 0,062 mM (und16-O-Me-FC-H) und 0,088 mM (ISIR-005) weisen auf eine schwache Stabilisierung der 14-3-3η-Tau-Tether-Wechselwirkung durch diese Wirkstoffe hin. Gleiches galt für die Untersuchung der Inhibierung. Die Wirkstoffe PTLR-1 und PTLR-2 zeigten eine noch geringere Wirkung auf den Komplex. Die Werte des IC₅₀ lagen hier im Bereich von 0,31 mM (PTLR-1) und 1,99 mM (PTLR-2).

Demnach müsste weiter auf die Suche nach geeigneten Wirkstoffen eingegangen werden. Die Stabilisatoren zeigten im Ansatz eine gute Wirkung. Möglicherweise könnten weitere Derivate dieser Stoffe eingesetzt und getestet werden.

Hinsichtlich der Inhibitoren müsste gezielter auf die Wechselwirkung von FAM-Tau-Tether mit 14-3-3 Proteinen eingegangen werden. Die eingesetzten Inhibitoren stammten aus einem Screening, welcher auf die spezifische Beeinflussung von 14-3-3 mit einem anderen Peptid angelegt war.

Es wurden erfolgreich Mutationen in die DNA-Sequenz des Plasmids pTYB12-Tau₂₀₇₋₃₂₈ eingefügt, um Phosphomimikry zu erzeugen. Die Aminosäuren Serin 214 wurde zu Aspartat und die Aminosäure Serin 324 zu Alanin punktmutiert. Die Expression und Aufreinigung der mutierten Tau-Form wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Es wurde eine weitere Phosphomimikry, Intein-Tau₂₀₇₋₃₂₈S214A,S324A, aufgereinigt. Die Konzentration des sich vermeintlich im Dialysat befindlichem Tau betrug nur 0,53 mg/mL. Mit Hilfe des Western Blots sollte überprüft werden, ob die zu sehenden Banden auf den Spuren im erhaltenen Gelbild (Abb. 10) tatsächlich das Protein Tau darstellen. Jedoch war der Western Blot mit einem Antikörper gegen Tau (Anti-Tau) unspezifisch. Ein zweiter Western Blot mit dem Antikörper für Intein (Anti-CBD) zeigte an, dass vermutlich kein Tau aufgereinigt wurde.

Demnach könnte weiterführend zunächst die mutierte DNA pTYB12-Tau₂₀₇₋ ₃₂₈S214D,S324A transformiert und exprimiert werden. Diese besitzt, wie die in der Arbeit aufgereinigte Form des Intein-Tau₂₀₇₋₃₂₈S214A,S324A, ebenfalls einen Intein-*tag.* Der Erfolg der Aufreinigung könnte mit einem frischen Antikörper Anti-Tau erneut überprüft werden. Des Weiteren könnte ein Tau-Peptid mit C-terminalem His-*tag* und wie bereits zuvor mit N-terminalem Intein-*tag* hergestellt und aufgereinigt werden. Möglicherweise verhindert der His-*tag* einen C-terminalen Abbau des Proteins während der Aufreinigung. Zusätzlich kann der Western Blot mit einem Antikörper spezifisch gegen His-*tag* durchgeführt werden um zu überprüfen, ob die zuvor gestellte Annahme sich bestätigt. Der Oberflächenassay mit den Tau-Phosphomimikry zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen dem GST-*getaggten* Peptid Tau und den 14-3-3 Proteinen in Abhängigkeit der Bindestellen S214 und S324 zeigte ebenfalls keine verwertbaren Ergebnisse. Die gewählte Methode eignete sich schlussfolgernd nicht zur Untersuchung der Ausbildung einer Wechselwirkung.

Mit Hilfe des SPR (*Surface Plasmon Resonance*) könnte die Untersuchung des Bindungsverhaltens zwischen Tau und 14-3-3 erneut durchgeführt werden. In diesem Zusammenhang sollte auch die Aufreinigung der Inteinfusionierten Tau-Peptide erfolgen. Der Vorteil der Tau-Peptide mit GST- bzw. Intein-*tag* ist der, dass lange Peptide mit ihrer Originalsequenz exprimiert werden können. Die bei der Fluoreszenz-Polarisationsmessung eingesetzten FAM-Tau-Peptide beinhalteten in der Sequenz lediglich die für die Bindung an 14-3-3 verantwortlichen Phosphoserine sowie die Aminosäuren welche diese umgeben.

Demzufolge könnte mit der SPR-Methode die Wechselwirkung zwischen einem längeren Tau-Peptid und 14-3-3 Proteinen untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zudem Proteinkristalle von Tau-Tether-14-3-3-Komplexen erzeugt und untersucht. Insgesamt wurden vier verschiedene Kristallkomplexe angesetzt. Diese umfassen die Komplexe von Tau-Tether mit 14-3-3 γ , β , η und ζ . Bislang konnte nur ein Kristall des Tau-Tether-14-3-3 ζ -Komplexes röntgenanalytisch untersucht werden. Jedoch waren die erhaltenen Daten nicht geeignet, um eine detaillierte Darstellung der Bindemotive des Tau-Tether-Peptids mit 14-3-3 Proteinen zu erreichen. Demzufolge können weiterführend die Optimierung des Kristallwachstums und deren röntgenanalytische Auswertung erfolgen.

7 Literatur

- Aitken, A. (2006). 14-3-3 Proteins: a Historic Overview. *Seminars in Cancer Biology*, *16*(3), 162-172. doi:10.1016/j.semcancer.2006.03.005
- Alonso, a D., Zaidi, T., Novak, M., Barra, H. S., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (2001). Interaction of tau isoforms with Alzheimer's disease abnormally hyperphosphorylated tau and in vitro phosphorylation into the disease-like protein. *The Journal of biological chemistry*, *276*(41), 37967-73. doi:10.1074/jbc.M105365200
- Ballio, A., Chain, E., & Leo, P. D. (1964). Fusicoccin: a New Wilting Toxin produced by Fusicoccum amygdali Del. Retrieved from http://www.nature.com/nature/journal/v203/n4942/abs/203297a0.html
- Drewes, G. (2004). MARKing tau for tangles and toxicity. *Trends in biochemical sciences*, *29*(10), 548-55. doi:10.1016/j.tibs.2004.08.001
- Emsley, P., & Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography, 60*(Pt 12 Pt 1), 2126-32. International Union of Crystallography. Retrieved from http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?ba5070
- Finnie, C., Borch, J., & Collinge, D. B. (1999). 14-3-3 Proteins: Eukaryotic Regulatory Proteins With Many Functions. *Plant molecular biology*, *40*(4), 545-54. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10480379
- Ganguly, S., Weller, J. L., Ho, A., Chemineau, P., Malpaux, B., & Klein, D. C. (2005). Melatonin synthesis: 14-3-3-dependent activation and inhibition of arylalkylamine Nacetyltransferase mediated by phosphoserine-205. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(4), 1222-7. doi:10.1073/pnas.0406871102
- Gardino, A. K., Smerdon, S. J., & Yaffe, M. B. (2006). Structural determinants of 14-3-3 binding specificities and regulation of subcellular localization of 14-3-3-ligand complexes: a comparison of the X-ray crystal structures of all human 14-3-3 isoforms. *Seminars in cancer biology*, *16*(3), 173-82. doi:10.1016/j.semcancer.2006.03.007
- Hashiguchi, M., Sobue, K., & Paudel, H. K. (2000). 14-3-3zeta is an effector of tau protein phosphorylation. *J Biol Chem*, *275*(33), 25247-25254. doi:10.1074/jbc.M003738200
- Hermeking, H. (2003). The 14-3-3 cancer connection. *Nat Rev Cancer*, *3*(12), 931-943. doi:10.1038/nrc1230
- Hernandez, F, & Avila, J. (2007a). Tauopathies. Cell Mol Life Sci, 64, 2219-2233.
- Hernandez, F, & Avila, J. (2007b). Tauopathies. Cell Mol Life Sci, 64, 2219-2233.
- Hernandez, Felix, Cuadros, R., Avila, J. J. J., & Hern Indez, F. (2004). Zeta 14-3-3 protein favours the formation of human tau fibrillar polymers. *Neurosci Lett*, *357*(2), 143-146. doi:10.1016/j.neulet.2003.12.049
- Kabsch, W. (2010). Xds. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography, 66(Pt 2), 125-32. doi:10.1107/S0907444909047337

- Lee, G., Cowan, N., & Kirschner, M. (1988). The primary structure and heterogeneity of tau protein from mouse brain. *Science (New York, N.Y.), 239*(4837), 285-8. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3122323
- Liu, D., Bienkowska, J., Petosa, C., & Collier, R. (1995). Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein. Retrieved from http://www.nature.com/nature/journal/v376/n6536/abs/376191a0.html
- Mackintosh, C. (2004). Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins, *342*, 329-342.
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., & Read, R. J. (2007). Phaser crystallographic software. *Journal of applied crystallography*, *40*(Pt 4), 658-674. doi:10.1107/S0021889807021206
- Moore, B. W., Perez, V. J., & Gehring, M. (1968). Assay and regional distribution of a soluble protein characteristic of the nervous system. *Journal of neurochemistry*, *15*(4), 265-72. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4966699
- Morrison, D. K. (2009). The 14-3-3 proteins: integrators of diverse signaling cues that impact cell fate and cancer development. *Trends in cell biology*, *19*(1), 16-23. doi:10.1016/j.tcb.2008.10.003
- Muslin, a J., Tanner, J. W., Allen, P. M., & Shaw, a S. (1996). Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell*, *84*(6), 889-97. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8601312
- Ottmann, C., Yasmin, L., Weyand, M., Veesenmeyer, J. L., Diaz, M. H., Palmer, R. H., Francis, M. S., et al. (2007). Phosphorylation-independent interaction between 14-3-3 and exoenzyme S: from structure to pathogenesis. *EMBO J*, *26*(3), 902-913. European Molecular Biology Organization. Retrieved from http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601530
- Peng, C. (1997). Mitotic and G2 Checkpoint Control: Regulation of 14-3-3 Protein Binding by Phosphorylation of Cdc25C on Serine-216. *Science*, *277*(5331), 1501-1505. doi:10.1126/science.277.5331.1501
- Robert, M., & Mathuranath, P. S. (2007). Tau and tauopathies. *Neurology India*, 55(1), 11-6. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17272893
- Rose, R., Erdmann, S., Bovens, S., Wolf, A., Rose, M., Hennig, S., Waldmann, H., et al. (2010). Identification and structure of small-molecule stabilizers of 14-3-3 protein-protein interactions. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 49(24), 4129-32. doi:10.1002/anie.200907203
- Sadik, G., Tanaka, T., Kato, K., Yamamori, H., Nessa, B. N., Morihara, T., & Takeda, M. (2009). Phosphorylation of tau at Ser214 mediates its interaction with 14-3-3 protein: implications for the mechanism of tau aggregation. *J Neurochem*, *108*(1), 33-43. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05716.x
- Schumacher, B., Mondry, J., Thiel, P., Weyand, M., & Ottmann, C. (2010). Structure of the p53 Cterminus bound to 14-3-3: Implications for stabilization of the p53 tetramer. *FEBS Lett*, *584*(8), 1443-1448. doi:DOI: 10.1016/j.febslet.2010.02.065

- Vadim, M. C. and. (2009). Crystallizing membrane proteins using lipidic mesophases. *Nature protocols*, 4(5), 706-731. doi:10.1038/nprot.2009.31.Crystallizing
- Vincenz, C., & Dixit, V. M. (1996). 14-3-3 proteins associate with A20 in an isoform-specific manner and function both as chaperone and adapter molecules. *The Journal of biological chemistry*, *271*(33), 20029-34. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8702721
- Xiao, B., Smerdon, S., & Jones, D. (1995). Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signalling pathways. Retrieved from http://www.nature.com/nature/journal/v376/n6536/abs/376188a0.html
- Yaffe, M. B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P. R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S. J., et al. (1997). for 14-3-3^I: Phosphopeptide Binding Specificity, *91*, 961-971.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Dr. Christian Ottmann für die Übernahme des Erstgutachtens bedanken. Des Weiteren danke ich ihm für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Ermöglichung zur Anfertigung meiner Bachelorarbeit im Chemical Genomics Centre der Max-Planck Gesellschaft.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Daniel Rauh, welcher die Aufgabe des Zweitgutachters meiner Arbeit übernommen hat.

Ein besonderer Dank geht an meine Betreuerin Maria Bartel für ihre geduldige und motivierende Art mich bei Problemstellungen im Laboralltag zu unterstützen und ihr Engagement, mir Freude an wissenschaftlicher Arbeit zu vermitteln. Auch David Bier gilt mein besonderer Dank für seine ständige Hilfsbereitschaft und eine Einführung in die Proteinkristallisation.

Letztendlich möchte ich der Arbeitgruppe von Dr. Ottmann danken. Insbesondere folgende Personen: Manuela Molzan, Lars Röglin und Philipp Thiel, welche mir bei diversen Fragestellungen eine große Hilfe waren.

9 Anhang

9.1 Messdaten

Tabelle 24: Messdaten der dreifach Bestimmung des Oberflächenassays aus Kapitel 5.3.2.

Gemessene Anisotropie [mAu]								
G	ST-CT 66			GST				
20031	30289	23354	28621	35949	41720			
18791	18587	19558	20931	18737	19379			
17191	40360	16728	18915	42025	17706			
18375	13953	17035	18048	13672	17932			
15146	17438	16292	16622	22867	16491			
12632	15408	14689	15535	13433	15380			
12388	16146	15076	15804	15088	14482			
13490	15073	15575	15423	14447	14464			
12291	14998	15281	13835	15891	12904			
13706	14133	14334	14945	14376	14248			
13342	13399	13321	13595	12016	13456			
12251	11899	12538	12804	13373	12215			
	Gemess	sene Anis	otropie [mAU]				
GS	ST-Tau ₂₀₇	-	GS	GST-Tau ₂₀₇₋				
328 S 2	241A,S32	4A	328S241D,S324D					
28519	37666	37833	42711	31553	39505			
29251	26043	30463	33911	31037	29366			
26885	22005	27218	27968	27325	24800			
22881	20176	25694	24475	28556	23829			
23828	24427	25226	22930	23688	25995			
19977	22676	21392	21752	23165	25219			
19358	22948	22070	21020	21297	21964			
19962	22229	21264	21848	21986	21527			
17719	22620	22409	20751	22814	19102			
9.2 Vektorkarten



Abbildung 21: Karte des Vektors pProEX HTb der Firma Invitrogen

Quelle:

http://de-de.invitrogen.com/search/global/searchAction.action?query=pproex



Abbildung 22: Karte des Vektors pTYB mit der *Multiplen Cloning Site (MCS)* des Vektors pTYB12 der Firma IMPACT

Quelle:

http://www.neb.com/nebecomm/tech_reference/restriction_enzymes/dna_sequences_maps.as p#.UCf1U6CeaVI



Abbildung 23: Karte des Vektors pGEX-4T-1 der Firma GE Healthcare

Quelle:

http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/pgex_vectors_%28ge_healthcare%29/pGE X-4T-1/



9.3 Kristallographische Daten

Abbildung 24: Ramachandran-Plot der Kristallstruktur 14-3-3ζ-Tau-Tether₂₁₁₋₂₁₈(G)₁₄₋₃₁₉₋₂₃₈ pS214,pS324

 $\label{eq:tabelle} \textbf{Tabelle 25:} Statistik des Datensatzes und der Verfeinerung des Strukturmodells des Komplexes aus 14-3-3 \ensuremath{\xi\Delta C}\xspace$ und Tau_{pS214-(GGS)-pS324}

	14-3-3ξ/ Tau Tether
Zellparameter Raumgruppe <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å) α, β, γ (°)	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ 72.60 104.60 114.80 90.00, 90.00, 90.00
Datensatz Auflösung (Å)	41.358– 2.780 (2.90 - 2.78)
R _{merge} Ι / σΙ Vollständigkeit (%) Redundanz	0.08 (0.44) 13.05 (4.09) 99.55 (99.7) 5.35 (5.67)
Strukturverfeinerung Auflösung (Å) Anzahl Reflexe R _{work} / R _{free}	42.44 – 2.78 (2.85– 2.78) 22537 (1424) 0.2024 / 0.2776 (0.300 0.367)
Modellstatistik Nicht-H-Atome <i>B</i> -Faktor R.m.s. Abweichungen Bindungslänge (Å) Bindungswinkel (°)	3816 65.369 3679 ; 0.014 ; 0.020 4958 ; 1.911 ; 1.976
Ramachandran plot bevorzugte Bereiche (%) erlaubte Bereiche (%) großzügig erlaubte und nicht erlaubte Bereiche (%)	92,5 6,0 1,6

9.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Tauopathie im Zusammenhang mit hyperphosphoryliertem Tau	6
Tabelle 2: Nährmedien	9
Tabelle 3: Puffer der Affinitätschromatographie	.10
Tabelle 4: Zusammensetzung des Gelpuffers	.11
Tabelle 5: Puffer des Western Blots	.11
Tabelle 6: Puffer des FP-Assays	.11
Tabelle 7: Puffer des Oberflächenassays	.12
Tabelle 8: Komplexierungspuffer der Kristallisation	.12
Tabelle 9: Primer	.13
Tabelle 10: Sequenzierprimer	.13
Tabelle 11: Eingesetzte Plasmide	.13
Tabelle 12: Eingesetzte Proteine bzw. Peptide	.14
Tabelle 13: 14-3-3 Isoformen	.15
Tabelle 14: Angewendete Geräte	.15
Tabelle 15: Pipettierschema der Ortsgerichteten Mutagenese	.17
Tabelle 16: Pipettierschema der Sequenzier-PCR	.18
Tabelle 17: Verschiedene Affinitäts- <i>tags</i> und ihre Wirkweise	.21
Tabelle 18: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE	.25
Tabelle 19: Die erhaltenen K _D -Werte der Isoformspezifitätsmessung der 14-3-3 Proteine mit FAM-Tau-Tether45	
Tabelle 20: Die erhaltenen EC ₅₀ -Werte der Messung von FAM-Tau-Tether ₂₀₇₋ ₃₂₈ pS214,pS324 mit 14-3-3η und den Stabilisatoren 16- <i>O</i> -Me-FC-H, ISIR-005	.49
Tabelle 21: IC50-Werte der Messung von FAM-Tau-Tether mit 14-3-3η und den Inhibitoren PTLR-1 und PTLR-2	.51
Tabelle 22: Pipettierschema des Oberflächenassays mit Tau	.54
Tabelle 23: Erhaltene Daten der Messung von GST-PMA2-CT66 und GFP-14-3-3	.55
Tabelle 24: Messdaten der dreifach Bestimmung des Oberflächenassays	.66
Tabelle 25: Statistik des Datensatzes und der Verfeinerung des Strukturmodells des Komplexes aus 14-3-3 $\xi\Delta$ C und Tau _{pS214-(GGS)-pS324}	.71

9.5 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: 14-3-3 σ Dimer (Monomer A hellblau, Monomer B, grün) mit p53pT387 Peptid (gelbe Stabform und Regenbogenband)
Abbildung 2: Darstellung der drei verschiedenen Bindemotive von 14-3-3
Abbildung 3: Die sechs verschiedenen Tau-Isoformen
Abbildung 4: Vergleich der Strukturen Fusicoccin A (FC-A), 16-O-Me-FC-A, ISIR-005 8
Abbildung 5: Schema der Fluoreszenzpolarisationsmessung
Abbildung 6: Schema des hängenden Tropfens (A) und des sitzenden Tropfens (B) 30
Abbildung 7: 12% Tris-Trizin-Gel der Aufreinigung von 14-3-3η VL
Abbildung 8: 12% Tris-Trizin-Gel der Aufreinigung von GST
Abbildung 9: 15 % Tris-Trizin-Gel nach Zellaufschluss von Tau ₂₀₇₋₃₂₈ S214A,S324A37
Abbildung 10: 15 % Tris-Trizin-Gel der Aufreinigung von Tau207-328S214A,S324A
Abbildung 11: Membran des Western Blots mit Anti-Tau Antikörper
Abbildung 12: Membran des Western Blots mit Anti-CBD Antikörper
Abbildung 13: Auftragung der normalisierten Signale gegen die 14-3-3 Konzentration.44
Abbildung 14: Die Kurven der Isoformspezifitätsmessung von FAM-Tau ₂₁₀₋₂₁₈ pS214 und FAM-Tau ₃₂₀₋₃₂₈ pS324 mit den 14-3-3 Isoformen
Abbildung 15: Logarithmische Auftragung der erhaltenen Daten gegen die Konzentration der titrierten Stabilisatoren 16- <i>O</i> -Me-FC-H und ISIR-00548
Abbildung 16: Logarithmische Auftragung der erhaltenen Daten gegen die Konzentration der titrierten Inhibitoren PTLR-1 und PTLR-250
Abbildung 17: Alignment der Originalsequenz von Tau ₂₀₇₋₃₂₈ und die Sequenz der mutierten Tau-Plasmide Tau 1 und Tau 253
Abbildung 18: Kristallstruktur des Komplexes 14-3-3ζ-Tau-Tether ₂₁₁₋₂₁₈ (G) ₁₄₋₃₁₉₋₂₃₈ pS214, pS324
Abbildung 19: Detailansicht der zwei Bindekanäle des 14-3-3ζ-Tau-Tether ₂₁₁₋₂₁₈ (G) ₁₄₋₃₁₉₋₂₃₈ pS214, pS324-Komplexes57
Abbildung 20: Detailansicht der zwei Bindekanäle des 14-3-3ζ-Tau-Tether ₂₁₁₋₂₁₈ (G) ₁₄₋₃₁₉₋₂₃₈ pS214,pS324-Komplexes als Cartoon-Darstellung58
Abbildung 21: Karte des Vektors pProEX HTb der Firma Invitrogen
Abbildung 22: Karte des Vektors pTYB mit der <i>Multiplen Cloning Site (MCS)</i> des Vektors pTYB12 der Firma IMPACT
Abbildung 23: Karte des Vektors pGEX-4T-1 der Firma GE Healthcare
Abbildung 24: Ramachandran-Plot der Kristallstruktur 14-3-3ζ-Tau-Tether ₂₁₁₋₂₁₈ (G) ₁₄₋ ₃₁₉₋₂₃₈ pS214,pS32470