

Untersuchung der Protein-Protein-Interaktionen zwischen dem Kalium-Kanal TRESK (KCNK 18) und 14-3-3 Proteinen

Bachelorarbeit

im Studiengang Chemische Biologie

Philine Hagel

Angefertigt am Chemical Genomics Centre Dortmund in Kooperation mit dem

Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie Dortmund

Dortmund, im August 2012

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst bei Herrn Dr. Christian Ottmann für das Übernehmen des Erstgutachtens bedanken. Des Weiteren danke ich ihm für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe am Chemical Genomics Centre der Max-Planck Gesellschaft anzufertigen und für die interessante Themenstellung.

Meinem Zeitprüfer, Herrn. Prof. Dr. Rauh, möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Besonderer Dank gilt auch David Bier und Maria Bartel, die bei Fragen und Problemen immer gern weitergeholfen und mir viel Spaß an der Arbeit im Labor vermittelt haben. Auch bei Manuela Molzan bedanke ich mich für ihre hilfreichen Ratschläge und Tipps.

Sascha Gentz und Adrian Glas danke ich für die überaus schnelle und tatkräftige Unterstützung bei der Peptidsynthese.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis, Chemikalienverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Die 14-3-3 Proteine	1
1.1.1. Struktur	1
1.1.2. Funktion	3
1.2. Der Interaktionspartner: Kaliumkanal TRESK KCNK 18	5
1.2.1. Phylogenetische Einordnung/Klassifizierung	5
1.2.2. Funktion	6
1.2.3. Regulation und Interaktion mit 14-3-3 Proteinen	6
2. Zielsetzung	9
3. Material und Methoden	10
3.1. Material:	10
3.1.1. Konstrukte, Enzyme	10
3.1.2. Bakterienstämme	11
3.1.3. Primer (Ortsspezifische Mutagenese)	11
3.1.4. Nährmedien	12
3.1.5. Puffer	13
3.1.6. SDS-Gele	15
3.1.7. Geräte	16
3.1.8. Kits	16
3.2. Methoden:	17
3.2.1. Ortsspezifische Mutagenese mit PCR	17
3.2.2. Transformation via Hitzeschock	18
3.2.3. DNA-Isolierung, -Sequenzierung und -Fällung	18
3.2.4. Proteinexpression und Zellaufschluss	20
3.2.5. Aufreinigung über Affinitätschromatographie und Gelfiltration	21
3.2.6. SDS-PAGE	22
3.2.7. Fluoreszenz-Polarisations Assay	23
3.2.8. Proteinkristallisation und Röntgenkristallographie	25

4. Ergebnisse und Diskussion	29
4.1. Herstellung von 14-3-3 Mutanten durch Ortsspezifische Mutagenese	29
4.2. Expression und Aufreinigung der 14-3-3 Mutanten	32
4.2.1. 14-3-3 γ Mutante	32
4.2.2. 14-3-3 ϵ Mutante	36
4.3. Kristallisation der Binärkomplexe	37
4.3.1. 14-3-3 σ Δ C Mutante mit TRpS und TRe	37
4.4. Fluoreszenz-Polarisations-Assays	46
4.5. Herstellung einer TRESK KCNK 18 Mutante durch Ortsspezifische Mutagenese	50
5. Zusammenfassung und Ausblick	52
6. Literatur	54
7. Anhang	57
7.1. Tabellenverzeichnis	57
7.2. Abbildungsverzeichnis	57
7.3. Vektorkarten	59
7.4. Kristallographische Daten und Ramachandran-Plots der Kristallstrukturen	61
Eidesstattliche Erklärung	66

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère
Å	Angström
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
C	Celsius
DEAE	Diethylaminoethyl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleotidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
ssDNA	einzelsträngige DNA (engl. single stranded DNA)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FAM	Carboxyfluorescein
FP	Fluoreszenz-Polarisation
g	Gramm
HBS	HEPES gepufferte Salzlösung
ITS	Initialscreen
K	Kelvin
kDa	Kilodalton
K _D	Bindungskonstante
L	Liter
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	mikromolar
mA	Milliampère
mg	Milligramm
mL	Milliliter
mM	millimolar
min	Minute
M	molar [Mol/Liter]
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	nanomolar

OD	optische Dichte
OD ₆₀₀	Lichtabsorption bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. rotations per minute)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV	Säulenvolumen
TB	terrific broth
T _M	Schmelztemperatur
TM	Transmembran (Domänen)
TEV	Tobacco Etch Virus
V	Volt

Chemikalienverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Rinderserumalbumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
KCl	Kaliumchlorid
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
TCEP	Tris(2-Carboxyethyl)phosphin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

1. Einleitung

1.1. Die 14-3-3 Proteine

Die in Eukaryoten zu findenden 14-3-3 Proteine bilden eine Gruppe acider, hoch konservierter Proteine, welche eine Größe von etwa 30 kDa pro Monomer aufweisen (Aitken, 2006; Gardino, Smerdon, & Yaffe, 2006; Hermeking, 2003).

Ihre Benennung geht auf die Nomenklatur von Moore und Perez zurück (Finnie, Borch, & Collinge, 1999; G. Moore BW, Perez VJ, 1968). Sie beruht auf der Identifizierung und Einordnung löslicher Proteine aufgrund ihres Elutionsverhaltens bei einer DEAE (Diethylaminoethyl)-Cellulose-Säulenchromatographie und der Wanderungseigenschaften bei der Stärke-Gel-Elektrophorese. Die erstmals aus Rinderhirn isolierten Proteine wurden bei der Säulenchromatographie in Fraktion 14 eluiert und zeigten bei der nachfolgenden 2D-Elektrophorese die Migrationskoordinaten 3.3, welche das relative Molekulargewicht und die Ladung angeben (Aitken, 2006).

14-3-3 Proteine sind in allen Eukaryoten zu finden (Hermeking, 2003), wobei sich die Organismen in der Anzahl der Isoformen unterscheiden. Sowohl bei Spalt- als auch bei knospenden Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae* und der Fliege *Drosophila melanogaster* sind zwei Isoformen bekannt, wohingegen Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* bis zu 15 verschiedene Isoformen aufweisen (Coblitz et al., 2005; Gardino et al., 2006; Mackintosh, 2004).

Im menschlichen Organismus wurden bislang sieben Isoformen identifiziert. Diese werden nach den griechischen Buchstaben α , β , γ , δ , ϵ , η , σ , τ und ζ benannt, wobei α und δ die phosphorylierten Formen der β und ζ Isoformen sind (Jones, Ley, & Aitken, 1995; Yaffe et al., 1997). Die meisten Isoformen (α bis η) werden hauptsächlich in Hirnzellen exprimiert, sind aber auch in fast allen anderen Geweben zu finden. τ ist in T-Zellen angesiedelt und die Expression von 14-3-3 σ ist auf Epithelzellen beschränkt (Aitken, 2006; Hermeking, 2003; Jones et al., 1995).

1.1.1. Struktur

Die 14-3-3 Proteine setzen sich aus zwei Monomeren mit einer Größe von je etwa 30 kDa zusammen, die über einige Reste ihres N-Terminus (Aminosäurepositionen 80-90) miteinander wechselwirken und sich so in der typischen "W-Form" zu Homo- oder Heterodimeren zusammenlagern (Aitken, 2006; Jones et al., 1995; Petosa, 1998). Dabei bilden einige der Isoformen, welche eine hohe Sequenzhomologie untereinander aufweisen, bevorzugt Homodimere aus (14-3-3 σ und γ). Von anderen Isoformen wie 14-3-3 ϵ wird hingegen Heterodimerisierung präferiert (Morrison, 2009).

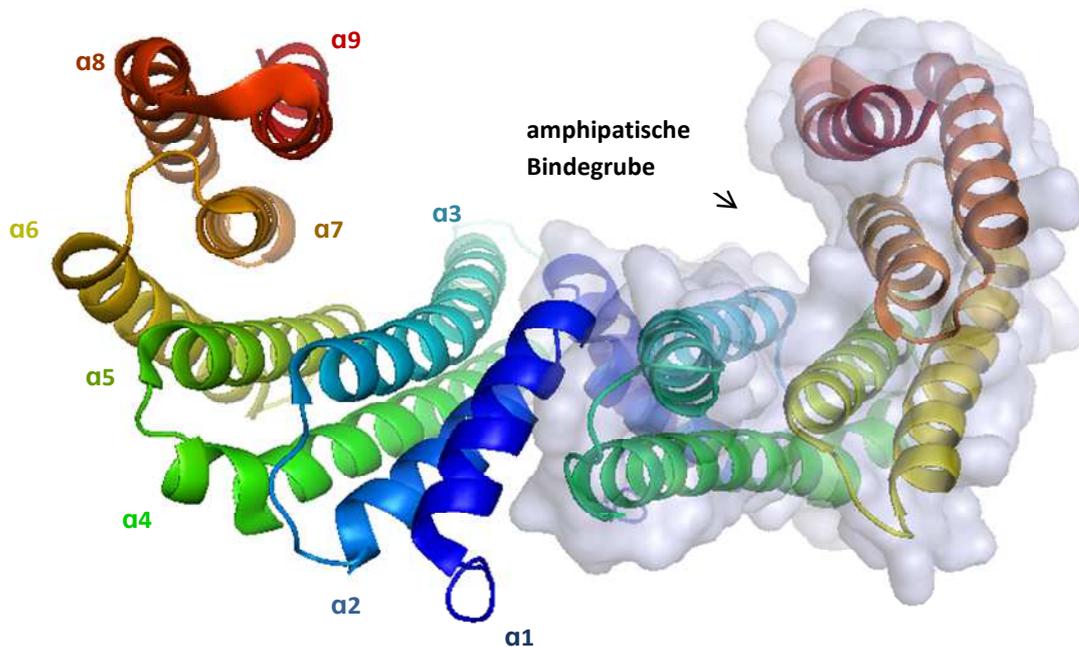


Abbildung 1.1: Gezeigt ist die antiparallele Helices-Anordnung eines 14-3-3 σ Dimers als Cartoon-Darstellung. Die Ausbildung einer amphipatischen Bindegrube wird durch die Oberflächendarstellung eines Monomers abgebildet. In blau zu sehen ist der N-Terminus, der C-Terminus ist rot markiert. Die Grafik wurde mit PyMol erstellt nach Struktur PDB ID 3P1N.

Durch röntgenkristallographische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass jedes der beiden Monomere aus neun antiparallelen α -Helices besteht (Fu, Subramanian, & Masters, 2000). Die N-terminalen Helices 1 - 4 sind dabei an der Dimerisierung beteiligt, die Helices 3, 5, 7 und 9 formen die für die Protein-Protein-Interaktion wichtige amphipatische Bindegrube beziehungsweise den Bindekanal (Petosa, 1998; Yaffe et al., 1997), der auch in Abb. 1.1 dargestellt ist. Dieser ist etwa 35 Å breit und 20 Å tief (Yaffe et al., 1997). Auf der außen liegenden Oberfläche des Kanals ist der Grad der Konservierung im Gegensatz zum Grubeninneren gering, wodurch die Isoformen - trotz ihrer hohen Sequenzhomologie untereinander - Isoformspezifität aufweisen (Finnie et al., 1999). Besonders wichtig für die Wechselwirkungen mit anderen Proteinen sind die polaren Aminosäuren der Helices α 3 und α 5 und die hydrophoben Aminosäuren von Helix α 7 und α 9. Diese befinden sich auf der Innenseite der Bindegrube (Hermeking, 2003).

1.1.2. Funktion

Den regulatorischen 14-3-3 Proteinen wird eine immer wichtiger werdende Rolle zugeschrieben, da sie in essentielle zelluläre Prozesse involviert sind (Morrison, 2009). Zu diesen zählen Signaltransduktion (Yaffe et al., 1997), Kontrollpunkte des Zellzyklus sowie der Genexpression und der Apoptose (Gardino et al., 2006; Hermeking, 2003), Proteintranslokation (Aitken, 2006) und Metabolismus (Gardino et al., 2006; Huber, MacKintosh, & Kaiser, 2002).

Die Proteine selbst besitzen keine enzymatische Aktivität, sondern vermitteln ihre Wirkung durch die Bindung eines Interaktionspartners und die Beeinflussung dessen Funktion oder der Struktur (Konformationsänderung) (Mackintosh, 2004). Gebunden wird der Interaktionspartner dabei über den Bindekanal des Monomers, sodass zwei Konsensussequenzen der Partnerproteine zeitgleich mit einem 14-3-3 Dimer wechselwirken können (Finnie et al., 1999; Fu et al., 2000; Morrison, 2009). Bis heute sind etwa 200 dieser 14-3-3 Liganden bekannt. Dazu gehören unter anderem Transkriptionsfaktoren, Tumorsuppressoren, Signalmoleküle, Kinasen, (Membran-)Rezeptoren und Phosphatasen (Morrison, 2009; Zhao et al., 2011).

Über verschiedene Mechanismen können die 14-3-3 Proteine, abhängig von den zellulären Bedingungen (Huber et al., 2002), die Aktivität ihrer Zielmoleküle steigern oder erniedrigen (Fu et al., 2000). Außerdem besitzen sie die Fähigkeit, Wechselwirkungen zwischen zwei Proteinen zu inhibieren oder aber zu induzieren. Im zweiten Fall fungieren sie als Adapter- oder auch verbrückende Proteine (Dixit, 1996; Zhao et al., 2011). Des Weiteren können sie die zelluläre Lokalisation ihrer Interaktionspartner beeinflussen (Finnie et al., 1999; Fu et al., 2000). Die verschiedenen Interaktionen zwischen 14-3-3 Proteinen und ihren Partnern können dabei sowohl durch abweichende 14-3-3-Konzentrationen in Zellen als auch durch Modifikationen der Regulatorproteine beeinflusst werden (Fu et al., 2000).

Muslin und Kollegen entdeckten in den 90er Jahren, dass die Bindung der Interaktionspartner an 14-3-3 Proteine über ein Phosphoserin/-threonin erfolgt, weshalb sie auch als Phosphoserin/-threonin-bindende Proteine bezeichnet werden. Im Laufe der Jahre wurden zwei Bindemotive beschrieben: RSX-pS/T-XP (mode I) und RXF/YX-pS/T-XP (mode II) (Gardino et al., 2006; Yaffe et al., 1997). Das X in der Sequenz steht dabei für eine beliebige Aminosäure. Diese Motive sind in fast allen Sequenzen der 14-3-3 Protein-Protein-Interaktionspartner zu finden. Ein weiteres Bindemotiv wurde identifiziert, welches am C-Terminus lokalisiert ist und als mode III bezeichnet wird: [pS/pT]X₁₋₂-COOH (Ottmann, Marco, et al., 2007). Dies verfügt über eine vergleichbare Bindungsaffinität wie die N-terminalen Bindemotive (Coblitz et al., 2005). Eine schematische Darstellung dieser drei Motive ist in Abbildung 1.2 zu finden.

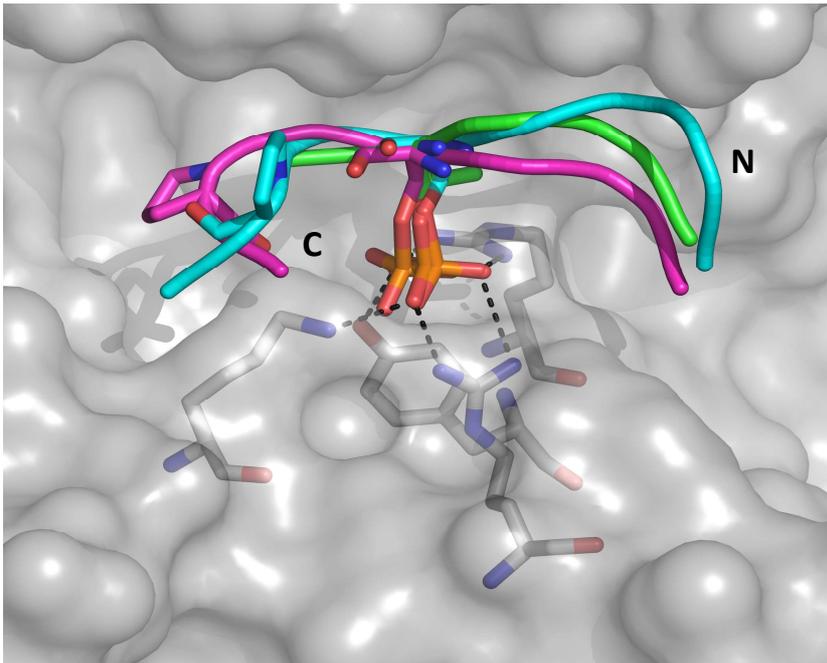


Abbildung 1.2: Zu sehen ist eine Überlagerung der Backbones der mode I – III Peptide, als Stickdarstellung hervorgehoben ist der jeweils phosphorylierte Rest und das Prolin an +2 Position. Die Oberfläche des Monomers ist in grau dargestellt, mode I in magenta, mode II ist in türkis gezeigt und mode III in grün.

(Quelle: <http://hdl.handle.net/2003/295589>)

Neben den phosphorylierungsabhängigen Wechselwirkungen interagieren die 14-3-3 Proteine nur mit wenigen Proteinen, die eine nicht-phosphorylierte Sequenz aufweisen (Fu et al., 2000). Als Beispiele hierfür dienen mitochondriale Zielsequenzen und die ExoenzymS (ExoS)-ADP-Ribosyltransferase (Fu et al., 2000; Ottmann, Yasmin, et al., 2007).

Aufgrund der vielen Interaktionspartner aus zellulären Signal- und Kontrollwegen spielen die 14-3-3 Proteine eine sehr bedeutende Rolle in Krankheiten. So zählen sie zu den entscheidenden Faktoren in Signalwegen, die bei Krebs- (Hermeking, 2003; Mackintosh, 2004) und Stoffwechselerkrankungen überreguliert sind. Ebenso sind sie bei Desregulierung beispielsweise in neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer, Creutzfeldt-Jakob und Parkinson involviert (Aitken, 2006; Fu et al., 2000). Ein konkretes Beispiel für eine neurologische Störung beziehungsweise Fehlfunktion stellt das Krankheitsbild Migräne dar, welches auf den Funktionsverlust des Kaliumkanals TRESK KCNK 18 zurückgeführt wird (Andres-Enguix et al., 2012). Dieser gehört ebenfalls zu den Interaktionspartnern der 14-3-3 Proteine und wird als Teil dieser Arbeit im nächsten Abschnitt näher erläutert.

1.2. Der Interaktionspartner: Kaliumkanal TRESK KCNK 18

1.2.1. Phylogenetische Einordnung/Klassifizierung

Die zu den Ionenkanälen gehörenden Kaliumkanäle kommen allgemein in allen Säugetierzellen vor, sind aber auch in Pflanzen zu finden (Florian Lesage & Lazdunski, 2000; Sano et al., 2003). Sie werden auf Basis ihrer Kanaleigenschaften – der Anzahl von Transmembrandomänen (TM-Domänen) und Poren-bildenden Domänen (P-Domänen, engl. pore domain) – verschiedenen Unterfamilien zugeordnet. Es gibt Kaliumkanäle mit zwei, vier oder sechs TM-Domänen und ein oder zwei P-Domänen (Goldstein, Bockenhauer, O’Kelly, & Zilberberg, 2001; Sano et al., 2003).

Die Zwei-Poren Domänen Kaliumkanäle (engl. two-domain pore potassium channel, K2P channels) stellen eine der wichtigsten Familien dar und werden durch die Anwesenheit von vier TM-Domänen und zwei P-Domänen charakterisiert. Zwei Monomere, welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind, bilden dabei ein Dimer aus (Lesage et al., 1996). Vier P-Domänen bilden auf diese Weise eine Pore des Kaliumkanals aus (Florian Lesage & Lazdunski, 2000).

Zu einer der Unterfamilien der K2P-Kanäle gehört TRESK, dessen humane Form ein Interaktionspartner von 14-3-3 ist. TRESK steht dabei für TWIK-related spinal cord K⁺ channel (Sano et al., 2003). Der Zusatz KCNK 18 bezeichnet das codierende Gen (potassium channel, subfamily K, member 18), welches im menschlichen Genom auf Chromosom zehn lokalisiert ist (Sano et al., 2003). Die Benennung lässt sich darauf zurückführen, dass TRESK im Rückenmark (engl., spinal cord) beziehungsweise im dorsal root ganglion exprimiert wird (Enyedi, Braun, & Czirják, 2012; Sano et al., 2003). Höchstwahrscheinlich findet dessen Expression zudem in Regionen des zentralen und peripheren Nervensystems statt (Czirják, Tóth, & Enyedi, 2004; Enyedi et al., 2012). Die Expression von Kaliumkanälen im Allgemeinen ist in fast allen Geweben des Körpers verbreitet (Florian Lesage & Lazdunski, 2000).

Weitere Mitglieder der K2P-Familie sind: TREK (TWIK-related K⁺ channel), TRAAK (TWIK-related, arachidonic acid-stimulated K⁺ channel), TASK (TWIK-related acid sensitive K⁺ channel), THIK (Tandem pore domain halothane-inhibited K⁺ channel) und TALK (TWIK-related alkaline pH-activated K⁺ channel) (Sano et al., 2003).

An Bedeutung gewinnt der Kaliumkanal TRESK, da dieser eine Rolle in der Schmerz Wahrnehmung spielt (Czirják & Enyedi, 2010) und, in mutierter Form und dem daraus folgenden Funktionsverlust, mit dem Krankheitsbild Migräne zusammenhängt (Andres-Enguix et al., 2012; Enyedi et al., 2012).

1.2.2. Funktion

TRESK gehört zu den leak channels oder auch Background K^+ -Kanälen, die Kaliumionen selektiv permeieren lassen. Bei physiologischen K^+ -Konzentrationen strömen die Kaliumionen durch die Poren, welche dennoch nicht permanent geöffnet sind, nach außen, sodass sich ein Potential aufbauen kann (Goldstein et al., 2001).

Die Background K^+ -Kanäle sind nicht nur für die Regulation des ruhenden Membranpotentials von Nervenzellen zuständig (Florian Lesage & Lazdunski, 2000; Sano et al., 2003), sondern auch für die Kontrolle der Dauer und Amplitude eines Aktionspotentials (Goldstein et al., 2001; Patel & Lazdunski, 2004). Somit lässt sich feststellen, dass die K2P-Kanäle die Erregbarkeit von Zellen sowie von Muskeln sowohl beeinflussen als auch mit kontrollieren.

Hinzuzufügen ist, dass K2P-Kanäle allgemein in die Regulation der Muskelkontraktion, der Herzrate, der Hormonsekretion und des Zellvolumens involviert sind (Florian Lesage & Lazdunski, 2000; Sano et al., 2003) und eine wichtige Rolle bei Apoptose und Tumorgenese spielen (Patel & Lazdunski, 2004). Bei letzterem wird vor allem TASK-3 hervorgehoben. Möglicherweise vermitteln sie auch die Wirkung von Anästhetika (Goldstein et al., 2001). Dies geschieht über die Interaktion mit anderen Proteinen, was im nächsten Abschnitt näher thematisiert wird.

1.2.3. Regulation und Interaktion mit 14-3-3 Proteinen

Die Aktivität von leak channels ist an Proteinkinasen, die Anwesenheit von (un-)gesättigten Fettsäuren und Veränderungen des pH-Wertes sowie der Temperatur gekoppelt. TRESK reagiert dabei besonders empfindlich auf ungesättigte Fettsäuren und intrazellulären pH-Wechsel (Goldstein et al., 2001; Rahm et al., 2012; Sano et al., 2003) und wird Rezeptor-vermittelt reguliert (Czirják et al., 2004).

Im Gegensatz zu anderen Kaliumkanälen besitzt TRESK einen außergewöhnlich langen intrazellulären Loop zwischen den TM-Domänen, in dem wichtige regulatorische Regionen und Bindungsseiten für zwei Partnerproteine angesiedelt sind (Enyedi et al., 2012; Sano et al., 2003). Über diese Bindestellen erfolgt sowohl die reversible Aktivierung durch die Calcium-/Calmodulin-abhängige Proteinphosphatase Calcineurin (an Ser276) als auch die Interaktion mit 14-3-3 Proteinen (Andres-Enguix et al., 2012; Czirják, Vuity, & Enyedi, 2008; Enyedi et al., 2012).

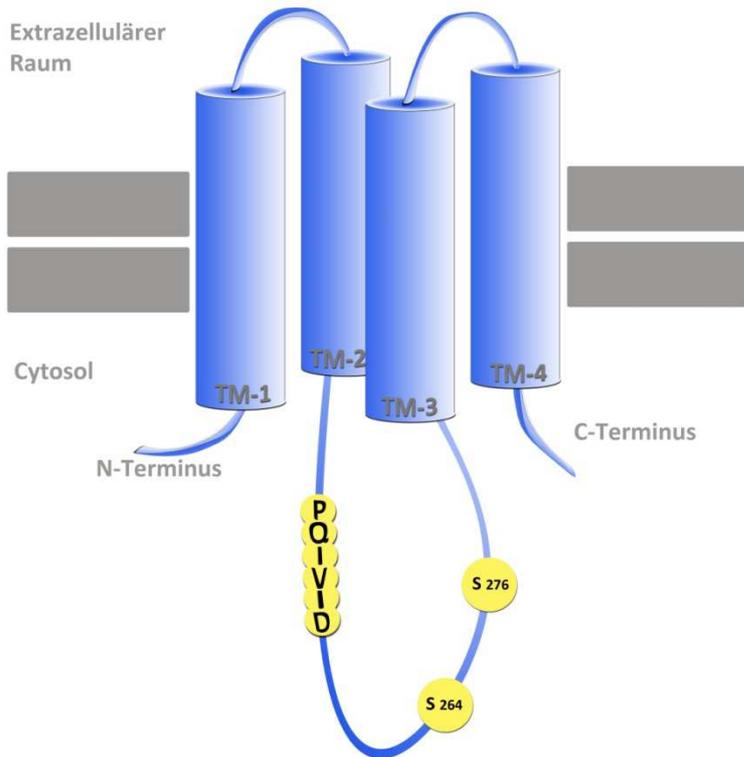


Abbildung 1.3: Die Abbildung zeigt den strukturellen Aufbau des Kaliumkanals TRESK. In blau zu sehen sind die vier TM-Domänen sowie der intrazelluläre Loop, in gelb sind das Aminosäure-Bindemotiv für Calcineurin (PQIVID) sowie die zwei für die TRESK-Regulation wichtigen Serine dargestellt. S₂₆₄ ist die Bindungsstelle für das 14-3-3 Protein.

Anders als bei den K₂P-Kanälen TASK und TREK wird TRESK durch das Ca²⁺-Signal aktiviert, wohingegen die beiden anderen Kanäle inhibiert werden (Czirják et al., 2004). Durch die Aktivierung von TRESK wird das ruhende Membranpotential stabilisiert und die Erregbarkeit in TRESK-exprimierenden Zellen herabgesetzt (Czirják et al., 2004, 2008).

Die Bindung eines 14-3-3 Proteins an TRESK ist phosphorylierungsabhängig und erfolgt sehr wahrscheinlich nach der Phosphorylierung des Loops (an Position Ser264) durch die Proteinkinase A. Das Protein bindet dabei direkt an das Aminosäure-Motiv RSNpSCP des intrazellulären Loops (Czirják et al., 2008; Enyedi et al., 2012). Durch die Bindung von 14-3-3 wird die Rückkehr des durch Calcineurin aktivierten TRESKs in den Ruhe- oder Erholungszustand inhibiert (Czirják & Enyedi, 2010; Enyedi et al., 2012). Konkurriert ein phosphoryliertes Peptid mit diesem Kanal um die Bindungsstelle des 14-3-3 Proteins, wird diese Inhibition deutlich verringert. Dies geschieht aufgrund der Besetzung der Bindegrube. Der exakte Mechanismus, wie 14-3-3 Proteine den TRESK-Kanal regulieren, ist dabei noch nicht vollständig geklärt und Gegenstand der aktuellen Forschung. Czirják und Kollegen

beschrieben 2008 in ihrer Arbeit zwei möglicherweise miteinander gekoppelte Wege der Kontrolle (Czirják et al., 2008).

Zum Einen wird TRESK an Position Ser264 phosphoryliert, woraufhin die unmittelbare Bindung eines 14-3-3 Proteins erfolgt. Dies führt zur Inhibition des K⁺-Kanals, indem die Abnahme des K⁺-Stroms nach der Aktivierung durch Calcineurin beschleunigt wird (Czirják & Enyedi, 2010). Diese Abnahme ist weiterhin von der Inhibierung der Kinase-Aktivität abhängig, welche für die Phosphorylierung von Ser276 verantwortlich ist. Welche Kinase das Ser276 phosphoryliert, ist bislang noch nicht bekannt. Der zweite Regulationsweg erfolgt ebenfalls über die Bindung eines 14-3-3 Proteins an Ser264, welche dazu führt, dass die Kontrolle des für die Kinase-Bindung notwendigen Ser276 aus sterischen Gründen verhindert wird. Möglich ist auch, dass die oben erwähnte Kinase selbst durch 14-3-3 inhibiert wird (Czirják & Enyedi, 2010).

Im Jahr 2008 stellten Czirják und Kollegen fest, dass die Regulierung der Aktivitätsdauer von TRESK über 14-3-3 Proteine Isoform-spezifisch abläuft. So erfolgt die Kontrolle über 14-3-3 γ und η , wohingegen die anderen Isoformen die TRESK-Aktivität nach einem Calcium-Signal nicht signifikant verlängern (Czirják et al., 2008).

2. Zielsetzung

Viele heutige Krankheitsbilder tragen ihren Ursprung in der Fehlfunktion körpereigener Proteine und Enzyme, welche sich meist auf Mutationen zurückführen lassen. Die Auswirkungen dieser Mutationen sind sehr unterschiedlich und reichen von gesteigerter Proteinaktivität bis hin zum völligen Funktionsverlust.

Um diese Auswirkungen beeinflussen zu können, werden bislang meist Inhibitoren der aktiven Zentren von Enzymen eingesetzt, was Einfluss auf die Interaktion zwischen Enzymen und ihren Regulatorproteinen haben kann. Ein anderer Ansatzpunkt ist die Stabilisierung solcher Wechselwirkungen mit Hilfe kleiner Moleküle. Als mögliches therapeutisches Ziel dieses neuartigen Ansatzes gewinnen die 14-3-3 Proteine immer mehr an Bedeutung, da sie eine Vielzahl von Interaktionspartnern aufweisen. Für den Einsatz von Inhibitoren oder Stabilisatoren müssen zunächst aber physiologische Aspekte der Proteine und deren Bindungspartner aufgeklärt werden, welche aufgrund der hohen Komplexität oftmals nicht bekannt sind. Die Proteinkristallographie stellt beispielsweise eine nützliche Methode dar, um die Struktur des Proteins auf atomarer Ebene zu lösen.

Ziel dieser Arbeit war es also, die Bindungseigenschaften verschiedener 14-3-3 Isoformen zum Kaliumkanal TRESK KCNK 18_{AS243-258} mittels Fluoreszenz-Polarisations (FP)-Messungen zu untersuchen und deren Dissoziationskonstanten K_d zu ermitteln. Diese geben Aufschluss über die Affinität zwischen der jeweiligen Proteinisoform und dem TRESK-Peptid. Für den Assay werden zwei 14-3-3 Bindesequenzen verschiedener Länge (PPQAMERSNpSCPELVL, AMERSNpSCPELVL) verwendet.

Um die Ergebnisse des FP-Assays zu verifizieren, sollten die Bindungen zwischen den 14-3-3 Isoformen γ , ϵ , η , σ und τ und dem Kaliumkanal TRESK KCNK 18 mittels Proteinkristallographie aufgeklärt werden. Dafür sollten zunächst die oben genannten Proteinisoformen mit dem Peptid, welches der Konsensussequenz entspricht, komplexiert und kristallisiert werden. Anschließend sollten die 14-3-3 Isoformen mit Cystein modifiziert, exprimiert und aufgereinigt werden. Diese Cysteinmutanten bauen bei der Komplexierung mit Peptiden (TRESK KCNK 18) eine intermolekulare Disulfidbrücke auf. Durch diese kovalente Bindung wird die Interaktion zwischen Protein und Peptid zusätzlich stabilisiert.

Weiterführendes Ziel ist die Glutamat-Modifikation des 14-3-3 Interaktionspartners (intrazellulärer Loop von TRESK) an einer Position, sodass für die Komplexierung auf die Phosphorylierung verzichtet werden kann. Nach der Komplexierung mit dem Glu-Peptid soll überprüft werden, ob die Stabilität der Disulfidbrücke in Kombination mit dem Glutamat ausreicht, um das phosphorylierte Serin zu ersetzen.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Konstrukte, Enzyme

Protein	Länge in AS	Mutationen	Tag	
14-3-3 gammaΔC	1-238	G174C	His-Tag	
14-3-3 epsilonΔC	1-232	G172C	His-Tag	
14-3-3 tauΔC	1-230	G169C	His-Tag	
TRESK KCNK 18				Sequenz
TRESKpS	243-258			PPQAMERSN(pS)CPELVL
TRESKe	243-258			PPQAMERSN(E)CPELVL
Intrazellulärer Loop	149 - 280	TDTGDILATILSTSYNRFKFPFFTRPLLSKWCPKSLFKKKPDPKPADEAVPQIIISAEELPG PKLGTCSRPSCSMELFERSHALEKQNTLQLPPQAMERSNSCPELVLGRLSYSIISNLDEV GQQVERLD		

Enzyme	Hersteller
Dnase I	Roche
Dpn I	New England Biolabs®
Pfu Turbo DNA Polymerase	Stratagene/Agilent
TEV-Protease	MPI Dortmund

3.1.2. Bakterienstämme

Bakterienstamm zur heterologen Expression eukaryotischer Proteine:

Escherichia coli Rosetta™ 2 (DE3)

Genotyp: F– *ompT hsdSB* (rB – mB –) *gal dcm* (DE3) pRARE2 (Cam^R)

3.1.3. Primer (Ortsspezifische Mutagenese)

Die Primer wurden bei der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bestellt.

Primernamen	Sequenz 5' → 3'
<u>14-3-3 Epsilon ΔC:</u>	
G172C_a_e	CAACGCATCCTATTCGCTTATGTCTTGCTCTCAATTTTC
G172C_as_e	GAAAAATTGAGAGCAAGACATAAGCGAATAGGATGCGTTG
<u>14-3-3 Gamma ΔC:</u>	
G174C_s_g	CCCACCCCATCCGATTATGCCTGGCTC
G174C_as_g	GAGCCAGGCATAATCGGATGGGGTGGG
<u>14-3-3 Tau ΔC:</u>	
G169C_s_t	CACACCCAATCCGCCTGTGCCTTGCTCTTAACCTTTTC
G169C_as_t	GAAAAGTTAAGAGCAAGGCACAGCGGATTGGGTGTG
<u>TRESK KCNK 18 Loop</u>	
<u>Aspartat-Modifizierung:</u>	
TR_S252D_S	CCGCAGGCTATGGAACGTAGTAATGACTGTCCGGAAGT
TR_S252D_AS	CAGTTCGGACAGTCATTACTACGTTCCATAGCCTGCGG

3.1.4. Nährmedien

Alle Nährmedien wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt und nach Fertigstellung bei 121 °C autoklaviert.

TB-Medium:	24 g/L	Hefeextrakt
	12 g/L	Trypton
	9,4 g/L	di-Kaliumhydrogenphosphat
	2,2 g/L	Kaliumdihydrogenphosphat
	0,4 % (v/v)	Glycerin

LB-Medium:	10 g/L	Trypton
	5 g/L	Hefeextrakt
	10 g/L	NaCl

LB-Agarplatten: (+ Ampicillin)	16 g/L	Bacto Agar
	10 g/L	Bacto Trypton
	10 g/L	NaCl
	5 g/L	Hefeextrakt
	100 µg/mL	Ampicillin

SOC-Medium bei Transformationen	20 g/L	Trypton
	5 g/L	Hefeextrakt
	0,58 g/L	NaCl
	0,19 g/L	KCl
	2,03 g/L	MgCl ₂ x 6 H ₂ O
	2,46 g/L	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
	0,4 % (v/v)	sterile 50%ige (w/v) Glucose-Lösung

3.1.5. Puffer

Alle Puffer wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt.

Affinitätschromatographie über Ni-NTA Sepharose / Co-Säule		
Lysepuffer pH 7,4	50 mM	TRIS
	150 mM	NaCl
	5% (v/v)	Glycerol
	4 mM	β-Mercaptoethanol
	1 mM	PMSF
Waschpuffer pH 8	50 mM	TRIS
	500 mM	NaCl
	5% (v/v)	Glycerol
	25 mM	Imidazol
	1 mM	β-Mercaptoethanol
Elutionspuffer pH 8	50 mM	HEPES
	200 mM	NaCl
	5% (v/v)	Glycerol
	250 mM	Imidazol
	1 mM	β-Mercaptoethanol

Aufreinigung über Gelfiltration		
Gelfiltrationspuffer pH 7,4	25 mM	HEPES
	100 mM	NaCl
	10 mM	MgCl ₂
	1 mM	β-Mercaptoethanol oder TCEP

SDS-PAGE		
5x SDS-Probenpuffer	62,5 mM	Tris-HCl
	2% (v/v)	SDS
	5% (v/v)	β -Mercaptoethanol
	10% (v/v)	Glycerol
	Spatelspitze Bromphenolblau	
Kathodenpuffer (10x)	1 M	Tris
	1 M	Tricin
	1% (v/v)	SDS
Anodenpuffer (10x)	2 M	Tris
Coomassie-Färbelösung	50% (v/v)	Ethanol
	10% (v/v)	Essigsäure
	0,1% (v/v)	Coomassie Brilliant Blue 250
Entfärber-Lösung (1L)	700 mL	H ₂ O
	200 mL	Ethanol
	100 mL	Essigsäure

Komplexansatz für die Kristallisation		
Komplexierungspuffer	20 mM	HEPES
	2 mM	MgCl ₂

FP Assay		
Stammlösung HBS-Puffer (10x) pH 7,4	0,1 M	HEPES
	1,5 M	NaCl
	ad 1000 mL	H ₂ O
FP-Puffer (1x)	0,1 % (v/v)	Tween 20
	0,1 % (v/v)	BSA
	1% (v/v)	10x HBS

3.1.6 SDS-Gele

Die Angaben beziehen sich auf die Herstellung von 2 Gelen bei einer Dicke von 0,75 mm (Mini-PROTEAN™-Apparatur (BioRad)) (in mL).

	Trenngel (12%)	Sammelgel (5%)
Bis-Acrylamid (30%)	3,9	0,5
Gelpuffer	2,5	0,38
H ₂ O	3,2	2,1
APS (10%)	0,1	0,05
TEMED	0,01	0,005

3.1.7. Geräte

Geräte		Hersteller
Zentrifugen	Tischzentrifuge	Biofige 13, Heraeus
	Tischzentrifuge Minispin	Eppendorf
	Ultrazentrifuge	Avanti JA30i / J20XP Beckmann
Säulen	Ni, Co Säule (Co-NTA)	Qiagen / GE-Healthcare
	Gelfiltrationssäule	GE-Healthcare
	Affinitätschromatographie-	GE-Healthcare
	säule-Pumpsystem (Äkta-Purifier, Äkta-Explorer)	
Expression	Inkubatorschrank	Binder
	Schüttler	Infors HAT
Zellaufschluss	Hochdruckhomogenisator	Microfluidics Corporation
SDS-Gele	Proteingelkammer	Biorad
	Spannungsquelle Power-PAC 300	Biorad
Kristallisation	Pipettierroboter Phoenix	Art Robins Instruments
FP-Assay	Fluoreszenzspektrometer	Infinite500, Tecan
Weiteres	Konzentrationsbestimmung	Nanodrop, Thermo Scientific
	Küvettenphotometer	Eppendorf
	pH-Meter	inoLab, WTW
	Vortexer	Scientific Industries
	Thermocycler T 3000	Biometra

3.1.8. Kits

Kit-Systeme	Hersteller
Gene JET™ Plasmid Miniprep Kit	Fermentas

3.2. Methoden

3.2.1. Ortsspezifische Mutagenese

Als Grundwerkzeug für die Einbringung von Mutationen in die DNA der Isoformen dient die DNA-Amplifikation mittels einer PCR (Polymerasekettenreaktion, engl. polymerase chain reaction). Dieses Verfahren lässt sich in drei Schritte unterteilen, welche zyklisch wiederholt werden.

Während der ersten Phase, der Denaturierung, wird auf 95 °C erhitzt, sodass die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren der doppelsträngigen DNA (dsDNA) in zwei Einzelstränge aufbrechen.

Anschließend wird die Reaktion auf 42-68 °C abgekühlt, damit sich die komplementären Primer an die einzelsträngige DNA (ssDNA) anlagern können. Die Temperatur des Annealings richtet sich nach der jeweiligen Schmelztemperatur des Primers, welcher nach Länge und Sequenz ausgewählt wird, und sollte etwa 5 °C unterhalb der T_m liegen.

Bei der Elongation, dem abschließenden Schritt der PCR, wird die Temperatur auf 72 °C erhöht, damit die hitzebeständige Polymerase die Primer in 5'→3'-Richtung verlängern kann. Dies geschieht durch die Anlagerung von Desoxynucleotidtriphosphaten, kurz dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), welche nach der Abspaltung eines Diphosphats an die jeweilige 3'-OH-Gruppe geknüpft werden können. Als Polymerase dient beispielsweise Taq-Polymerase aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus*, die ihr Temperaturoptimum bei etwa 72 °C aufweist und somit die Primer schnell anlagern kann. In dieser Arbeit wurde Pfu Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* verwendet.

Im nächsten Zyklus dient die neu synthetisierte DNA bereits als Templat und ab dem dritten Zyklus wird sie exponentiell vervielfältigt.

Für die ortsspezifische Mutagenese wurde folgendes PCR-Programm verwendet und für die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes diente das darauffolgende Pipettierschema:

95° C	1 min	} 30 Zyklen
95° C	1 min	
55° C	1 min	
65° C	15 min	
65° C	30 min	
4° C	∞	

PCR-Ansatz 50 µL:	
Pfu 10x Puffer	5 µL
Primer_forward	x µL
Primer_reverse	x µL
Templat-DNA	1-2 µL (40-100 ng)
Pfu Turbo Polymerase	1 µL
ddH ₂ O	ad 50 µL

Die Primermenge richtet sich nach der Anzahl der Basenpaare des Primers und lässt sich mit der Formel

$$\frac{125 \text{ ng} \times 1000}{330 \times 23 (\text{Anzahl der Basenpaare des Primers})} = \mu\text{L}$$

berechnen.

Anschließend erfolgte der Restriktionsverdau der Plasmid-DNA durch das Enzym DpnI während einer 2-3 stündigen Inkubation bei 37 °C, um die nicht mutierte, methylierte DNA zu zerschneiden.

3.2.2. Transformation via Hitzeschock

Ziel der Transformation ist es, vorhandene DNA oder Plasmide in kompetente Bakterienzellen zu transformieren. Als kompetente Zellen dienten in dieser Arbeit *E. coli* Rosetta™ DE 3.

Zunächst wurden 100 µL chemisch kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und zu diesen 80-100 ng DNA gegeben. Nach 35 minütiger Inkubation auf Eis folgte der Hitzeschock für 1 Minute bei 42 °C im Thermomixer und im Anschluss eine 2 minütige Abkühlungsphase auf Eis. Anschließend wurden 200 µL vorgewärmtes SOC-Medium hinzugegeben und eine Inkubationszeit von 45 Minuten bei 37 °C eingehalten. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zentrifugation für 1 min bei 13000 g. Das Pellet wurde darauffolgend in etwa 50 µL des Überstands resuspendiert und auf einer mit Ampicillin (50 µg/mL) versetzten LB-Agarplatte unter sterilen Bedingungen ausplattiert. Inkubiert wurden die Agarplatten bei 37 °C über Nacht.

Die LB-Agarplatten mit Ampicillin wurden ausgewählt, da das verwendete Plasmid eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum aufweist. Dies führt zu einem Selektionsvorteil der Zellen, die das Plasmid erfolgreich aufgenommen haben.

3.2.3. DNA-Isolierung, -Sequenzierung und -Fällung

Um eine gewünschte Mutation verifizieren zu können, wurde die DNA aus den Bakterienzellen unterschiedlicher Kolonien einer Agarplatte mittels einer sogenannten Minipräparation isoliert.

Für die Isolation wurden 6 mL mit Ampicillin (100µM/mL) versetztes TB- oder LB-Medium mit einem Klon angeimpft und diese über Nacht bei 37 °C im Schüttler (150 rpm) inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Zellen durch Zentrifugation, 1 Minute bei 13000 rpm, geerntet. Anschließend erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA mittels GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit von Fermentas nach der Herstellerangabe.

Die geernteten Zellen wurden in 250 µL Resuspensionslösung, welche RNase enthält, resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µL Lysis- und 350 µL Neutralisationslösung wurde 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert, um den Überstand von den festen Bestandteilen der Suspension zu trennen. Der Überstand wurde in eine GeneJET™ spin column überführt und erneut 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Nachdem der Durchfluss verworfen wurde, wurde mit 500 µL Waschlösung gewaschen und zentrifugiert. Zur Elution der DNA wurden abschließend 50 µL Elutionspuffer hinzugegeben. Die Konzentration des Eluates konnte nach 2 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und 2 minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm mittels Nanodrop (Thermo Scientific) ermittelt werden.

Die DNA wurde anschließend bei -20 °C gelagert oder direkt zur Sequenzierung weiterverwendet, welche intern im Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie erfolgte.

Für die Sequenzierung müssen die Proben mit Hilfe einer Sequenzier-PCR vorbereitet werden. Dies erfolgt nach der Methode von Sanger oder auch der „Kettenabbruchmethode“. Im Unterschied zur „herkömmlichen“ PCR wird anstelle von dNTPs eine Mischung aus dNTPs und Fluoreszenz-markierten ddNTPs (Didesoxynucleotidtriphosphat, diese sind im Terminator Mix (BigDye, Applied Biosystems) enthalten) zugefügt. Wenn ein ddNTP statt eines dNTPs während der Elongation eingebaut wird, wird die Verlängerung des komplementären Stranges an dieser Stelle abgebrochen, da der Polymerase die 3'OH-Gruppe fehlt. Auf diese Weise entstehen verschieden lange Fragmente mit unterschiedlichen endständigen Basen, die nach ihrer Länge elektrophoretisch aufgetrennt werden können. Durch die differenten Fluoreszenz-markierten ddNTPs am Ende jedes DNA-Fragmentes zeigt die Fluoreszenz nach der Anregung unterschiedliche Farben, die dann von einem Detektor gemessen werden können.

Die Sequenzier-PCRs wurden nach folgendem PCR-Programm und Probenansatz durchgeführt:

96 °C	30 sec	} 30 Zyklen	<u>PCR Ansatz 20 µL:</u>	
96 °C	30 sec		t-Mix (Terminator Mix)	2 µL
50 °C	15 sec		Primer (5 µM)	1 µL
60 °C	4 min		Templat-DNA	150-300 ng
4 °C	∞		ddH ₂ O	ad 20 µL

Abschließend wurde die amplifizierte DNA mittels DNA-/Ethanol-Fällung aufgereinigt. Dazu wurde der Ansatz in 0,5 mL Reaktionsgefäße (Eppendorf) überführt und 2 μ L 3M NaAc, 2 μ L 125 mM EDTA und 50 μ L 100% EtOH zugegeben. Die Suspension wurde gevortext und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die DNA wurde bei 13000 rpm pelletiert und der Überstand mittels einer Pipette dekantiert. Nach zweimaligem Waschen mit je 200 μ L 70% EtOH und anschließendem Zentrifugieren wie oben beschrieben wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet.

3.2.4. Proteinexpression und Zellaufschluss

Mit der zuvor durch Sequenzierung verifizierten Kolonie oder angelegten Gefrierkultur wurden 250 mL mit Ampicillin versetztes TB- oder LB-Medium angeimpft und diese Vorkultur über Nacht bei 37 °C und 150 rpm im Schüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurde eine 5 L Hauptkultur (ebenfalls TB- oder LB-Medium mit Ampicillin in einer Konzentration von 100 μ g/mL) mit der Vorkultur angeimpft und das Wachstum der Zellen halbstündig über die OD₆₀₀ verfolgt. Die optische Dichte wurde über das Biophotometer bestimmt. Währenddessen wurde die Kultur weiterhin bei 37 °C und 150 rpm geschüttelt.

Bei einer OD₆₀₀ zwischen 0,6 - 0,8 wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 0,5 mM IPTG (Isopropyl-thiogalactopyranosid) induziert, die Temperatur auf 18 °C gesenkt und erneut über Nacht bei 150 rpm geschüttelt. Durch IPTG-Zugabe wird die Dissoziation des lac-Repressors vom lac-Operon bewirkt, wodurch die Polymerase an den Promotor binden und die Genexpression starten kann.

Die Zellernte erfolgte am darauffolgenden Tag bei 4500 rpm und 4 °C für 15 Minuten. Für den Zellaufschluss wurde das erhaltene Pellet in gekühltem Ni-NTA-Lysepuffer resuspendiert und mit DNase I versetzt. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Hochdruckhomogenisators (MicroFluidics) aufgeschlossen.

Um die löslichen von den unlöslichen Zellbestandteilen zu trennen, wurde bei 23000 rpm und 4 °C 30 Minuten lang zentrifugiert und die unlöslichen Bestandteile so pelletiert. Der Überstand wurde zur Aufreinigung auf eine Co-NTA-Affinitätschromatographie-Säule aufgetragen.

3.2.5. Aufreinigung über Affinitätschromatographie und Gelfiltration

Affinitätschromatographie:

Aufgereinigt werden die Proteine über eine Affinitätschromatographie, wofür sie am C- oder N-Terminus über einen spezifischen Affinitäts-Tag verfügen müssen. In diesem Fall besitzt das 14-3-3 Protein einen His-Tag, der sich durch zwei bis zehn zusätzliche Histidine (meist ein Hexapeptid) auszeichnet und womit sich das Protein durch Imidazol oder einen niedrigen pH-Wert eluieren lässt. Den Histidinen nebenstehend befindet sich eine Proteaseschnittstelle, an der der Affinitäts-Tag später abgetrennt werden kann. Der Tag dient zum spezifischen, aber reversiblen Binden des Zielproteins an das Säulenmaterial, während andere Proteine, die nicht mit diesem His-Tag versehen sind, nicht an die Säule haften können. Diese unspezifisch bindenden Proteine können mit Waschpuffer entfernt werden. Die Elution der Proteine erfolgt über einen Puffer, der eine der Säule gegenüber hoch affine Substanz in hoher Konzentration enthält. Durch diesen Puffer wird das mit dem His-Tag modifizierte Protein von der Säule verdrängt.

Für die Aufreinigung wurde in dieser Arbeit eine 30 mL Co-NTA-Säule verwendet, die zunächst mit 3 Säulenvolumen (SV) Lysepuffer und einer Flussrate von 4 mL/min äquilibriert wurde. Nach dem Beladen der Säule mit dem Zelllysats über eine Peristaltikpumpe (2 mL/min) wurde die Säule mit 10 SV Ni-NTA-Waschpuffer (ebenfalls 2 mL/min) gewaschen. Die abschließende fraktionierte Elution mit 3 SV Elutionspuffer erfolgte mit einer Flussrate von 1 mL/min, bei der Imidazol anstelle des His-Tags an die Säule bindet und das Protein somit verdrängt. Durch das Messen der Absorption bei 280 nm während der gesamten Aufreinigung konnten die das Protein enthaltenden Fraktionen identifiziert werden. Alle Aufreinigungsschritte erfolgten am Chromatographie-System Äkta Purifier.

Um den Erfolg der Aufreinigung zu kontrollieren, wurden Proben des Zelllysats, des Säulendurchflusses, der Waschfraktion und der Eluate genommen, damit diese anschließend über eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert werden konnten.

Die vereinigten Protein enthaltenden Eluatfraktionen wurden in Zentrifugen mit einem Cut off von 30 kDa auf etwa 1 mL aufkonzentriert und das Enzym Tobacco Etch Virus (TEV)-Protease zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die TEV-Protease dient dabei zur spezifischen Entfernung des His-Tags vom Protein und besitzt die Aminosäure-Erkennungssequenz ENLYFQG. Der Schnitt erfolgt zwischen Glutamin und Glycin beziehungsweise Serin.

Gelfiltration:

Zur weiteren Aufreinigung kann nach der Affinitätschromatographie eine Gelfiltration erfolgen. Die Gelfiltrationssäule zeichnet sich durch Poren im Säulenmaterial aus, welche die Auftrennung der Moleküle nach ihrer Größe möglich machen. Das Prinzip dabei ist, dass kleinere Moleküle und Verunreinigungen in die Poren hinein diffundieren können, während große Proteine nicht in die Poren eindringen. Daher benötigen Proteine mit größerem hydrodynamischen Radius weniger Zeit für den Weg durch die Säule. Aus diesem Grund lassen sie sich schneller eluieren.

Nach der Äquilibration der Säule (Sephacryl S200 von GE Healthcare, 320 mL Volumen) mit etwa 2 SV Gelfiltrationspuffer und einer Flussrate von 1 mL/min wurde das von der TEV-Protease verdaute Protein mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,8 mL/min auf die Säule geladen. Das fraktionierte Eluieren des Proteins (1 mL/min) erfolgte anschließend mit etwa 1 SV Gelfiltrationspuffer.

Ähnlich der Aufreinigung mittels der Affinitätschromatographie wurde während des zeitlichen Verlaufs die Absorption bei 280 nm gemessen, sodass nach der Elution die Protein enthaltenden 5 mL - Fraktionen über eine SDS-PAGE analysiert und in Zentrifugationskonzentratoren (Amicon Ultra, MWCO 30 kDa) auf ein Endvolumen von 1 mL einkonzentriert werden konnten.

Nach der Aufkonzentrierung wurde das Protein aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

3.2.6. SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient zur Überprüfung der Reinheit und zur Bestimmung des Molekulargewichts eines isolierten Proteins.

Bei der SDS-PAGE werden die Proteine durch Anlegen einer Spannung nach ihrer Größe aufgetrennt, wobei kleine Moleküle schneller in Richtung der Anode wandern als große. Dazu müssen zunächst die Disulfid- und Wasserstoffbrückenbindungen der Protein-Tertiärstruktur durch β -Mercaptoethanol reduziert werden, wodurch die Proteine denaturiert werden und in einen linearen Zustand übergehen. Hinzugegebenes Natriumdodecylsulfat (SDS, engl. Sodiumdodecylsulfat) dient zur Angleichung der Ladungsdichte aller Proteine und verursacht eine negative Ladung durch die Bindung an hydrophobe Regionen im Proteininneren. Etwa 1,4 g SDS binden pro Gramm Protein, sodass das Ladungs-Masse-Verhältnis aller Proteine etwa gleich wird.

Als „Trägermaterial“ wurden Polyacrylamid-Gele verwendet, welche durch die Copolymerisation von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid hergestellt werden können. Durch Verwendung

verschiedener Konzentrationen und Verhältnisse der beiden Stoffe kann Einfluss auf die Porengröße genommen werden.

Vor Auftragung auf das Gel wurden die Proben mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt und zur vollständigen Denaturierung 5 Minuten bei 95 °C im Thermoblock erhitzt. Anschließend wurden 10 µL der Proben und 5 µL eines Proteinmarkers (Page Ruler, Prestained Protein Ladder der Firma Fermentas), der zur Größenbestimmung der Proteine dient, auf die in 3.1.6. genannten SDS-Gele aufgetragen. Nach Befüllen der inneren Gelkammer mit Kathodenpuffer sowie der äußeren Gelkammer mit Anodenpuffer (Zusammenstellung siehe 3.1.5.) wurde die Elektrophorese bei einer Spannung von 55 mA (Angabe für ein Gel) gestartet.

Die Gele wurden nach dem Elektrophoresedurchlauf bei leichtem Schütteln für 10 Minuten in Coomassie Blue-Färbelösung angefärbt, um die Proteinbanden sichtbar zu machen. Bei der anschließenden Entfärbung der Gele wurde die unter 3.1.5. genannte Entfärber-Lösung verwendet, sodass nachfolgend nur bei den Proteinbanden eine Blaufärbung zu sehen war.

3.2.7. Fluoreszenz-Polarisations Assay

Das Prinzip der Fluoreszenz-Polarisation (FP, engl. fluorescence polarization/anisotropy) basiert auf der Anregung eines mit einem Fluorophor modifizierten Moleküls. Erfolgt diese Anregung mit (linear) polarisiertem Licht bei einem sich bewegenden oder viel mehr rotierenden Molekül, so führt dies zur Depolarisierung des Lichts. Wird ein Molekül mit einem weiteren Molekül gekoppelt, kommt es aufgrund des größeren Molekülvolumens zu einer langsameren beziehungsweise eingeschränkten Rotation. Das emittierte Licht bleibt polarisiert, es kann sogar eine Zunahme der Polarisation beobachtet werden.

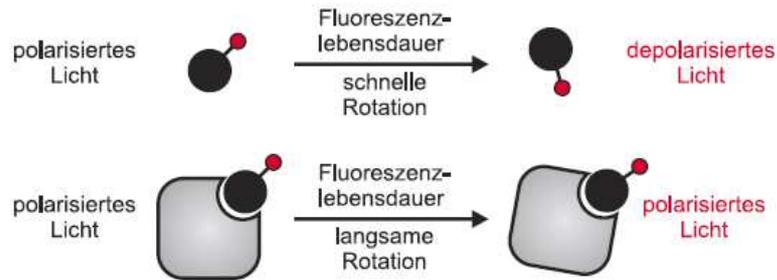


Abbildung 3.1: Unterschiede der Rotation und Fluoreszenz-Polarisation kleiner und großer Moleküle
(Bild: "PNA-Peptid-PNA Chimären - Werkzeug zur hybridisierungs-basierten Kontrolle der Peptidkonformation und für Protease-Screenings", Dissertation Dr. Lars Röglin, Humboldt-Universität Berlin, Januar 2008)

Die Änderungen des emittierten Lichts können in einem FP-Assay durch die Titration des Bindungspartners bestimmt werden. Aus dieser Messung von konstanter Liganden- und variabler Rezeptorkonzentration kann mit Hilfe nicht-linearer Regression die Dissoziationskonstante K_d gewonnen werden. Der K_d -Wert gibt Aufschluss über die Affinität zwischen dem Peptid und dem Protein. Die Begriffe „Rezeptor“ und „Ligand“ sind hierbei nicht wörtlich gemeint, sondern sie bezeichnen zwei verschiedene Moleküle und sind gegeneinander austauschbar. Als Rezeptor werden in dieser Arbeit die sieben Isoformen des 14-3-3 Proteins verstanden, unter dem Liganden die fluoreszenzmarkierten Peptide mit Sequenzen verschiedener Länge des intrazellulären Loops vom Kaliumkanal TRESK KCNK 18.

Zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Ligand wurde das FAM Peptid mit dem frisch angesetzten, filtrierten FP-Puffer (1x) zunächst auf eine Konzentration von 100 nM verdünnt. Dazu wurden 5 μ L Peptid in 5 mL FP-Puffer (1x) suspendiert. Anschließend wurden 18 μ L der Puffer-Peptid-Suspension im ersten Well jeder Reihe einer Assay-Platte mit 384 Wells (Corning Assay Platten, Corning Incorporated, USA) vorgelegt. Durch Zugabe von 2 μ L der 14-3-3 Isoformen in das erste Well wurde mit Hilfe einer Mehrfachkanal-Pipette (Eppendorf, Hamburg) eine Verdünnungsreihe pipettiert. Dabei wird die Proteinkonzentration von Well zu Well halbiert. Die vorletzte Spalte jeder Assay-Platte diente als Referenzwert der Messung und enthielt nur die Puffer-Peptid-Suspension, die letzte wurde als Blank genutzt (nur FP-Puffer (1x)). Für jede Isoform wurde eine Dreifach-Bestimmung durchgeführt.

Das Messen und Aufnehmen der Daten erfolgte über das Fluoreszenzspektrometer Infinite500 der Firma Tecan, die Datenauswertung erfolgte mit Hilfe der Software GraphPad Prism.

3.2.8. Proteinkristallisation und Röntgenkristallographie

Notwendig für die Kristallisation von Proteinen sind deren Reinheit und die Eigenschaft, Kristallstrukturen ausbilden zu können. Die Kristalle bestehen aus sich periodisch wiederholenden Einheiten (auch Elementarzellen genannt) in einem Kristallgitter, welche durch intermolekulare Wechselwirkungen flexibel zusammengehalten werden. Aufgrund der Tatsache, dass die Kristallstrukturen keine starre Konformation einnehmen sondern flexibel bleiben, kann eine Proteinkristallstruktur als Modell für den nativen Zustand eines Proteins angesehen werden.

Zwischen den Proteinmolekülen befinden sich Hohlräume, in denen sich Kristallwasser ansammelt und durch die die umgebende Pufferlösung diffundieren kann. Durch Entfernen des Wassers kann sich zunächst ein Kristallkeim und daraus später ein Kristall entwickeln. Diese Art der Kristallerzeugung wird als Dampfdiffusionsmethode bezeichnet. Dabei wird zwischen der Methode des sitzenden Tropfens (engl. sitting drop) und der des hängenden Tropfens (engl. hanging drop) unterschieden.

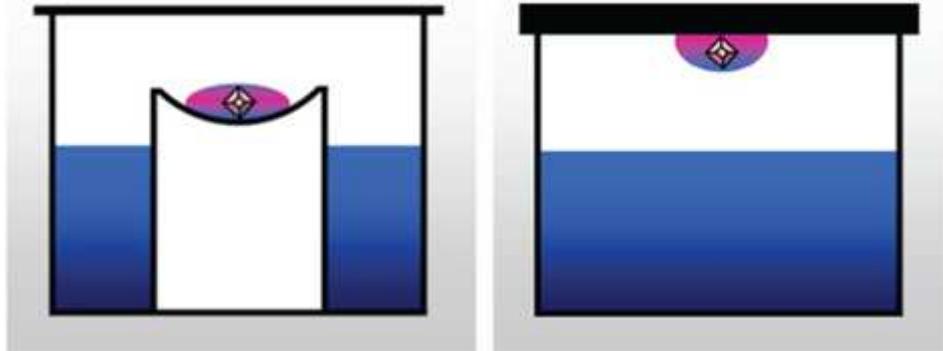


Abbildung 3.2: Dampfdiffusionsmethode mittels der Methode des sitting (links) oder hanging (rechts) drop
(Bild: <http://crystal.csiro.au/en/About/Vapour-Diffusion.aspx>)

Das Prinzip dieser Technik beruht auf der Gleichgewichtseinstellung zweier unterschiedlicher Lösungen – der Reservoirolösung und der des Proteintropfens – in einem abgeschlossenen System, die über eine Gasbrücke miteinander verbunden sind. Da die Konzentration der Präzipitantien im Proteintropfen verglichen mit der der Reservoirolösung geringer ist, wird das Wasser in Richtung des Reservoirs entzogen. Auf diesem Weg steigt die Konzentration des Protein-Peptid-Komplexes und auch die der Präzipitantien verhältnismäßig an. Es kommt zur Übersättigung, bei welcher die Keimbildung der Kristalle beginnt. Der Übergang der Proteinmoleküle aus der erwähnten übersättigten Phase in die feste Phase stellt den Prozess der Kristallisation dar.

Als Präzipitantien dienen Salze wie Ammoniumsulfat, Alkohole oder organische Polymere wie Polyethylenglucol (PEG). Durch Variation der Substanz-Konzentration oder auch des pH-Wertes und der Temperatur können verschiedene, in einem Initial-Screen (ITS) zu testende Kristallisationsbedingungen erhalten werden. Für den Screen wurden 96-well-Platten (Methode sitting drop) und sieben verschiedene Kristallisationslösungen eingesetzt. Dazu zählen Core I-IV, JCSG+, MPD und Cryos (alle der Firma Qiagen). Per Pipettierroboter Phoenix® wurde die Kristallisationslösung in das Reservoir pipettiert und je 0,1 µL der Komplexansätze im sogenannten Vial mit 0,1 µL der Reservoirlösung verdünnt. Nach dem luftdichten Versiegeln der Platte konnte der Kristallisationsfortschritt im Beobachtungssystem „Formulatrix®“ mit Hilfe des Computerprogramms „Rock Maker®“ verfolgt werden.

Solche Kristallisationsbedingungen, die sich bei einem Initial-Screen als erfolgreich erwiesen haben, wurden weiter optimiert. Ziel dieser Optimierung ist die Verfeinerung von Kristallentstehungsbedingungen. Dabei sollen Kristalle von möglichst hoher Qualität und entsprechend hohem Streuvermögen gezüchtet werden, da die Detailtreue der Struktur hierdurch beeinflusst wird.

Bei der Optimierung wurden 24-well-Platten (Methode hanging drop) verwendet. Die Ränder der 24 Kammern wurden für das luftdichte Abschließen nach Auflegen der Glasdeckelchen mit einer Silikonöl-Mischung bedeckt. Die Reservoirs der Kammern wurden mit 500 µL Puffer befüllt, wobei die Kristallisationsbedingung in jedem Well variiert wurde. Zur Züchtung der Kristalle wurden je 1 µL der Reservoirlösung mit 1 µL des Komplexansatzes auf einem Glasdeckelchen zusammenpipettiert, welche abschließend auf die Kammern platziert wurden. Die Kontrolle des Kristallisationsfortschritts erfolgte mit Hilfe eines Mikroskops über mehrere Tage.

Um letztendlich die Struktur eines Protein-Peptid-Komplexes zu bestimmen, bietet sich die Methode der Röntgenkristallographie an, die zu den Grundlagen der Strukturbiologie gehört. Bei diesem Verfahren wird gemessen, wie stark und in welche Richtung die Röntgenstrahlen von den Kristallen gebeugt werden. Die gebeugten Strahlen können sich durch konstruktive Interferenz verstärken (oder durch destruktive Interferenz auslöschen), wodurch bei der Bestrahlung eines Proteinkristalls ein Streubild gewonnen werden kann. Anhand des Beugungsmusters aus diesem Streubild kann die Elektronendichte-Verteilung eines kristallisierten Moleküls ermittelt werden. Dies erfolgt über die Stärke der auftretenden Beugungsmaxima, durch welche die Atomanordnung mit Hilfe mathematischer Verfahren innerhalb einer Elementarzelle berechnet werden kann.

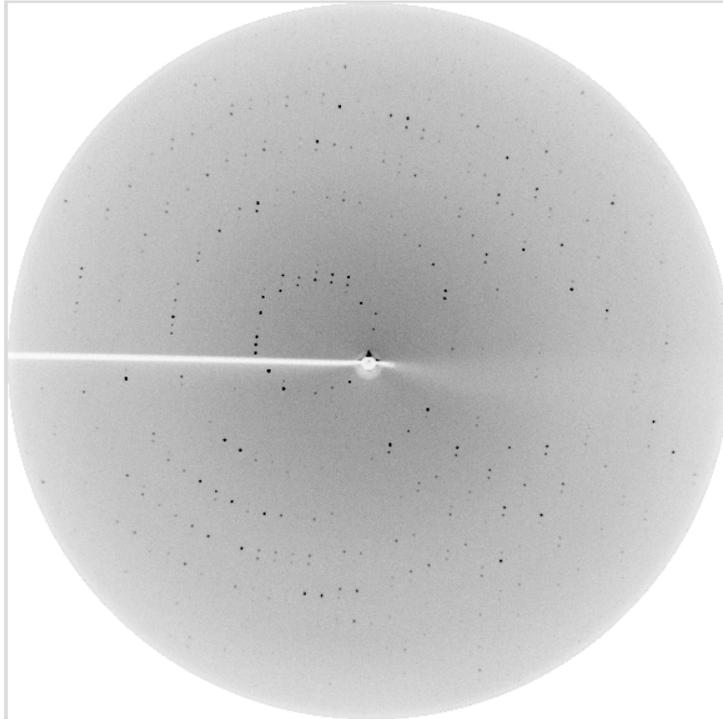


Abbildung 3.3: Beispiel eines Beugungsmusters, gezeigt ist der Kristall 14-3-3 η mit einer Sequenz des TRESK(pS) KCNK 18 (¹PPQAMERSN(pS)CPELVL¹⁶). Die äußere Auflösungsgrenze liegt bei 2,5 Å.

Um an Hand des Beugungsmusters eine Elektronendichtekarte zu erstellen, müssen viele Aufnahmen angefertigt werden. Dies geschieht über den Detektor in einem Röntgengenerator (auch Beamline genannt), dessen Auflösung im Gerät des Max-Planck-Institutes bei 1,5 Å liegt.

Während der gesamten Messung muss sichergestellt werden, dass der Proteinkristall kryogen/gekühlt bleibt. Kryogen bedeutet dabei das Einhalten einer extrem niedrigen Temperatur von etwa 110 K (entspricht -160 °C). Dies geschieht über einen Strahl aus Stickstoff und Trockenluft (100 K). Ist die Messung beendet, kann der Kristall wahlweise für weitere Anwendungen in flüssigem Stickstoff gelagert oder bei keinem erneuten Gebrauch verworfen werden.

Nach Aufnahme eines vollständigen Datensatzes beginnt die Auswertung für die Ermittlung der gesuchten Struktur. Dafür wurden die Diffraktionsbilder zunächst durch Datenprozessierung mit dem Programm XDS in Elektronendichtefunktionen umgewandelt (mathematische Integration über die Peaks der jeweiligen Beugungsreflexe). Es konnten sowohl die Raumgruppe als auch die Zellkonstanten bestimmt werden. Anschließend wurde der molekulare Ersatz mit Hilfe des Programms PHASER (J. Appl. Cryst. (2007). 40, 658-674. Phaser crystallographic software. A. J. McCoy, R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L.C. Storoni and R.J. Read.), CCP4i-Software (Collaborative Computational Project, Number 4. 1994. "The CCP4 Suite: Programs for Protein

Crystallography". Acta Cryst. D50, 760-763) durchgeführt. Die für die Lösung des Phasenproblems notwendige bekannte Struktur eines strukturell ähnlichen Proteins wurde über die PDB-Datenbank herausgesucht, wobei auf möglichst hohe Sequenzübereinstimmung geachtet wurde.

Die Verfeinerung der Struktur und die Validierung des Modells erfolgten mittels WINCOOT (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. doi:10.1107/S0907444904019158) und REFMAC (Murshudov, G. N., Vagin, A. A., & Dodson, E. J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography, 53(Pt 3), 240-55. doi:10.1107/S0907444996012255), ebenfalls CCP4i-Software. Anschließend wurden die in dieser Arbeit gezeigten Struktur-Bilder/-Abbildungen über PyMOL (DeLano, W.L. (2002). The PyMol Molecular Graphics System (San Carlos, CA: DeLano Scientific), www.pymol.org) erstellt.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Herstellung von 14-3-3 Mutanten durch Ortsspezifische Mutagenese

Für die Kristallisation mit dem TRESK-Peptid sollten zunächst Cystein-modifizierte Mutanten der 14-3-3 Isoformen γ , ϵ und τ hergestellt werden. Dabei wird an den Aminosäurepositionen 169 (14-3-3 τ), 172 (14-3-3 ϵ) und 174 (14-3-3 γ) ein Glycin gegen Cystein ausgetauscht. Diese Mutanten bilden bei der Komplexbildung eine intermolekulare Disulfidbrücke mit dem Peptid aus, sodass die Bindung zusätzlich stabilisiert wird.

Um die 14-3-3 Proteine spezifisch zu mutieren, wurden diese durch ortsspezifische Mutagenese mit den unter 3.1.3. aufgeführten Primern amplifiziert. Die so erhaltenen Konstrukte wurden nach dem DpnI-Verdau via Hitzeschocktransformation in kompetente *E. Coli* Rosetta DE 3 Zellen transformiert und auf Ampicillin-haltige LB-Agarplatten ausplattiert. Nach dem Anwachsen der Kolonien wurden mit diesen verschiedene Vorkulturen (6 mL mit Ampicillin versetztes LB-Medium) für die spätere Plasmidisolierung angeimpft und die DNA mit Hilfe des Gene JET™ Plasmid Miniprep Kits isoliert. Die anschließende Sequenzierung, welche mit Sequenzier-PCR und Ethanol-/DNA-Fällung vorbereitet wurde, lieferte für folgende Konstrukte positive Ergebnisse. Diese wurden durch Sequenz-Alignment verifiziert und sind nachfolgend aufgeführt.

14-3-3 γ Mutante:

```

1          HHDYDIPTTENLYFQGAMGSMVDREQLVQKARLAEQAERYDDMAAAMKNVTELNEPLSNE 60
2          -----MVDREQLVQKARLAEQAERYDDMAAAMKNVTELNEPLSNE 40
                *****

1          ERNLLSVAYKNVVGARRSSWRVISSIEQKTSADGNEKKIEMVRAYREKIEKELEAVCQDV 120
2          ERNLLSVAYKNVVGARRSSWRVISSIEQKTSADGNEKKIEMVRAYREKIEKELEAVCQDV 100
                *****

1          LSLLDNYLIKNCSETQYESKVFYLMKMGDYRYLAEVATGEKRATVVESSEKAYSEAHEI 180
2          LSLLDNYLIKNCSETQYESKVFYLMKMGDYRYLAEVATGEKRATVVESSEKAYSEAHEI 160
                *****

1          SKEHMQPHTPIRLCLALNYSVFYYEIQNAPEQACHLAKTAFDDAIAELDTLNEDSYKDST 240
2          SKEHMQPHTPIRLCLALNYSVFYYEIQNAPEQACHLAKTAFDDAIAELDTLNEDSYKDST 220
                *****

1          LIMQLLRDNLTLWTSDQQ----- 258
2          LIMQLLRDNLTLWTSDQQDDDGEGNN 247
                *****
    
```

Ergebnisse und Diskussion

14-3-3ε Mutante:

```
1      GSMDDREDLVYQAKLAEQAERYDEMVESMKKVAGMDVELTVEERNLLSVAYKNVIGARRA 60
2      --MDDREDLVYQAKLAEQAERYDEMVESMKKVAGMDVELTVEERNLLSVAYKNVIGARRA 58
      *****

1      SWRIISSIEQKEENKGGEDKMKMIREYRQMVETELKLI CCDILDVLDKHLIPAANTGESK 120
2      SWRIISSIEQKEENKGGEDKMKMIREYRQMVETELKLI CCDILDVLDKHLIPAANTGESK 118
      *****

1      VFYYKMGDYHRYLAEFATGNDRKEAAENSLVAYKAASDIAMTELPPTHPIRLCLALNFS 180
2      VFYYKMGDYHRYLAEFATGNDRKEAAENSLVAYKAASDIAMTELPPTHPIRLCLALNFS 178
      *****

1      VFYYEILNSPDRACRLAKAAFDIAIAELDTLSEESYKDSTLIMQLLRDNLTLWT----- 234
2      VFYYEILNSPDRACRLAKAAFDIAIAELDTLSEESYKDSTLIMQLLRDNLTLWTSMDMQGD 238
      *****

1      -----
2      GEEQNKEALQDVEDENQ 255
```

14-3-3τ Mutante:

```
1      DIPTTENLYFQGAMGSMEKTELIQKAKLAEQAERYDDMATCMKAVTEQGAELSNEERNLL 60
2      -----MEKTELIQKAKLAEQAERYDDMATCMKAVTEQGAELSNEERNLL 44
      *****

1      SVAYKNVVGRRSAWRVISSIEQKTDTSDDKQLIKDYREKVESELRSICTTVLELLDKY 120
2      SVAYKNVVGRRSAWRVISSIEQKTDTSDDKQLIKDYREKVESELRSICTTVLELLDKY 104
      *****

1      LIANATNPESKVFYFLKMGDYFRYLAEVACGDDRKQTDIDNSQGAYQEAFDISKKEMQPTH 180
2      LIANATNPESKVFYFLKMGDYFRYLAEVACGDDRKQTDIDNSQGAYQEAFDISKKEMQPTH 164
      *****

1      PIRLCLALNFSVFYYEILNPNELACTLAKTAFDEAIAELDTLNEDSYKDSTLIMQLLRDN 240
2      PIRLGLALNFSVFYYEILNPNELACTLAKTAFDEAIAELDTLNEDSYKDSTLIMQLLRDN 224
      *****

1      LTLWTS----- 246
2      LTLWTSDSAGEECDAAEGAEN 245
```

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der folgenden online verfügbaren Tools:

<http://www.uniprot.org/>

(Proteindatenbank)

<http://web.expasy.org/translate/>

(zum Translatieren der DNA-Sequenz in die Aminosäuresequenz und zur Bestimmung des readings-frames)

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

(Sequenz-Alignment)

Die erfolgreich modifizierten Proteine wurden später exprimiert und aufgrund ihres His-Tags über eine Co-NTA-Säule aufgereinigt, um ein Protein mit ausreichender Reinheit zu erhalten, welches mit dem TRESK-Peptid_{AS243-258} co-kristallisiert werden kann.

Anzumerken ist, dass die Ortsspezifische Mutagenese mehrfach wiederholt werden musste, da nicht alle sequenzierten Klone nach der ersten Mutagenese eine positive Mutation getragen haben. Dies kann an einem unvollständigen Restriktionsverdau durch DpnI liegen. Des Weiteren ist es denkbar, dass die Elongationszeiten zur Verlängerung der Primer durch die Anlagerung von dNTPs nicht ausreichend lang waren.

Auf den Agarplatten, die keine transformierten Klone aufwiesen, scheint es plausibel, dass die kompetenten Zellen das erforderliche Plasmid für die 14-3-3 Konstrukte nicht enthalten haben. Sehr wahrscheinlich ist auch, dass die Temperatur des Primer-Annealings bei der Mutagenese-PCR anfangs nicht ausreichend hoch gewählt wurde, sodass sich die Primer nicht an die Templat-DNA anlagern konnten. Diese Vermutung wird dadurch bestätigt, dass nach dem Erhöhen der Temperatur (im Zyklus der Mutagenese-PCR) Kolonien auf den Agarplatten gewachsen sind.

4.2. Expression und Aufreinigung der 14-3-3 Mutanten

Um die 14-3-3 Mutanten co-kristallisieren zu können, waren größere Mengen an reinem Protein erforderlich. Dazu wurde für jede der drei Isoformen zunächst eine Testexpression zur Überprüfung durchgeführt. Anschließend wurden die beiden 14-3-3 Isoformen γ und ϵ auch im großen Maßstab (5L-Kulturansätze) exprimiert. Da die Expression von 14-3-3 τ nur sehr geringe Ausbeuten erzielte, wurde diese bislang verworfen.

4.2.1. 14-3-3 γ Mutante

Nach der Expression von 14-3-3 γ in *E. coli* Rosetta DE3 Zellen wurden diese über eine 30 mL Cobalt-NTA-Säule aufgereinigt. Dabei wurden zur Kontrolle von jedem Schritt der Isolierung und Aufreinigung folgende Proben zur Analyse auf einem 12%-igem Tris-Tricin-Gel genommen: Überstand nach der Zentrifugation des Zelllysats, Durchfluss nach Beladen der Säule, Waschfraktion sowie aus den einzelnen Elutionsfraktionen.

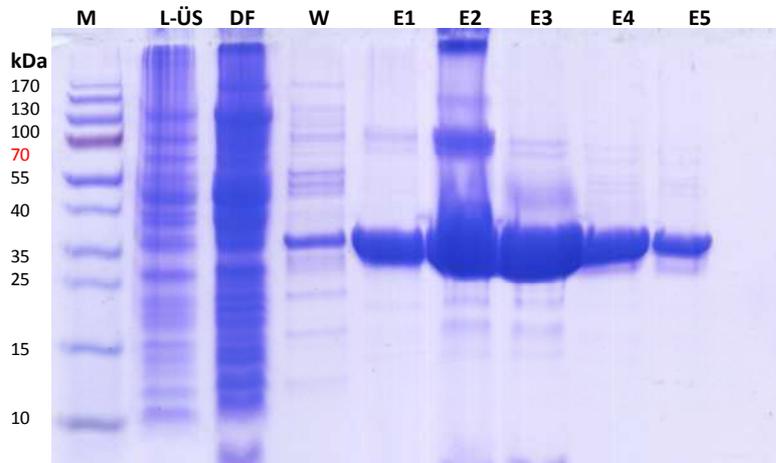


Abbildung 4.1: Das SDS-Gel zur Kontrolle der Reinheit des Proteins zeigt auf Bahn M: Marker Page Ruler, Prestained Protein Ladder, Fermentas®. Bahn ÜS-L bezeichnet: Überstand des Zelllysats nach der Zentrifugation, DF: Durchfluss beim Beladen der Säule und W: Waschfraktion. E1 - E5 entsprechen den Eluatfraktionen, wobei E1 die Probe A7 aus dem Chromatogramm (Abb. 4.2) bezeichnet. Nachfolgende Eluate stellen die weiteren Proben A8-A11 aus dem Absorptionspeak dar. Von allen Proben wurde das gleiche Volumen aufgetragen (10 μ L), die Konzentrationen variierten.

Die proteinhaltigen Fraktionen wurden an Hand des folgenden Absorptionsspektrums von der Affinitätschromatographie ausgewählt.

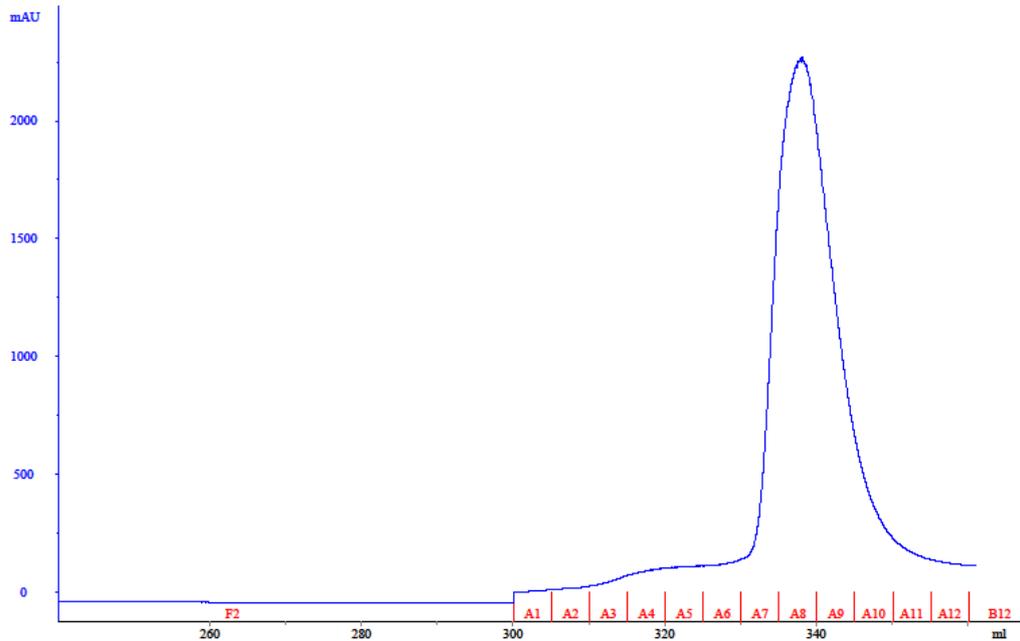


Abbildung 4.2: Gezeigt ist das Chromatogramm der Aufreinigung von 14-3-3 γ . Der Peak signalisiert die Elution des Proteins in den Fraktionen A7-A11.

Auf dem Gelbild ist zu erkennen, dass die Bahnen \ddot{U} S-L und W bis E5 eine deutliche Bande bei etwa 32 kDa aufweisen. Diese stellt das 14-3-3 γ Protein mit His-Tag dar, welches aufgrund seiner Überexprimierung in verhältnismäßig hoher Konzentration vorliegt. Bahn \ddot{U} S-L zeigt die Probe nach dem Abzentrifugieren des Zellysats. Da sich in dieser Probe noch alle Zellproteine befinden, sind mehrere Banden zu identifizieren.

Auf der dritten Spur ist die Probe DF dargestellt, welche den Durchfluss bei dem Beladen der Säule zeigt. Aus den vielen Banden lässt sich schließen, dass ein Teil der Zellproteine nicht an die Säule gebunden hat und somit bereits vom Zielprotein abgetrennt wurde. Eine schwache Bande ist allerdings auch bei etwa 32 kDa zu erkennen, was zeigt, dass möglicherweise nicht das komplette Protein an die Säulenmatrix gebunden hat. Dies kann an der zu hohen Konzentration liegen, was ein „Überladen“ der Säule bedingt. Auch auf Bahn W, welche die Waschfraktion bezeichnet, spiegelt sich die 14-3-3 γ -Bande wider, was sich erneut auf eine zu hohe Konzentration und das dadurch bedingte Auswaschen oder den geringen Anteil von Imidazol im Waschpuffer zurückführen lässt. Zusätzlich

sind einige weitere Banden zu erkennen. Diese demonstrieren, dass einige der an die Säule gebundenen Verunreinigungen mit Hilfe des Waschschrilles entfernt werden konnten. Die folgenden fünf Bahnen signalisieren die Eluatfraktionen des Peaks, welche alle eine deutliche Bande bei etwa 32 kDa aufweisen und somit darlegen, dass das Protein erfolgreich eluiert wurde. Schwache Banden bei einer Größe von 70 kDa lassen sich möglicherweise durch eine unvollständige Reduzierung des Dimers zum Monomer erklären, stellen aber keine Verunreinigung dar. Da bei den Eluaten keine weiteren signifikanten Proteinbanden auszumachen sind, kann davon ausgegangen werden, dass keine unspezifisch gebundenen Proteine mehr auf der Säule gewesen sind und der Reinheitsgrad des Proteins bereits nach der Affinitätschromatographie hoch war.

Die vereinigten Fraktionen (A7-A11) wurden anschließend auf 1 mL mit einer Konzentration von 75,20 mg/mL aufkonzentriert und durch die TEV-Protease verdaut, welche spezifisch den His-Tag vom Protein schneidet. Nach dem Verdau wurde das 14-3-3 Protein auf eine Gelfiltrationssäule (320 mL Volumen) aufgetragen, um die Rückstände der TEV-Protease sowie möglicherweise noch vorhandene Verunreinigungen zu entfernen. Zur Überprüfung des TEV-Verdaus sowie zur Reinheitskontrolle wurden Proben des ungeschnittenen und geschnittenen Proteins und einige proteinhaltige Fraktionen der Gelfiltration auf ein SDS-Gel aufgetragen.

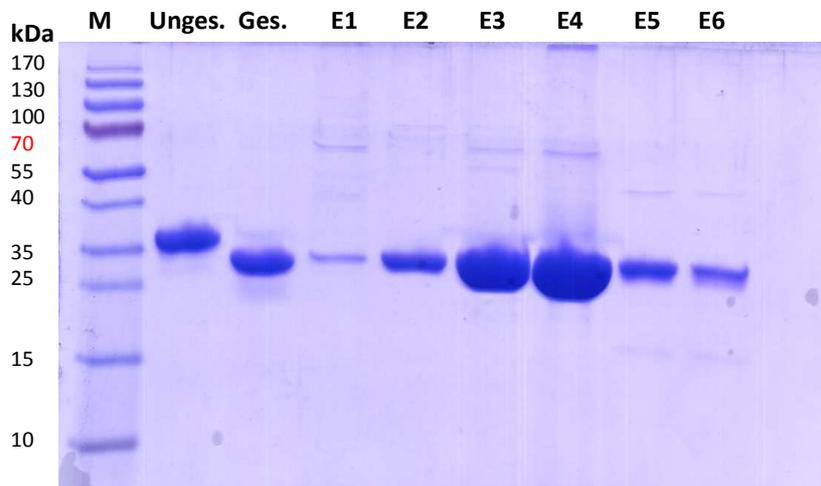


Abbildung 4.3: Auf dem Gelbild abgebildet sind auf Bahn M der Marker Page Ruler, Prestained Protein Ladder, Fermentas®, auf Bahn Unges. das ungeschnittene 14-3-3γ Protein, auf Bahn Ges. hingegen das geschnittene Protein. Die Bahnen E1-E6 repräsentieren die Eluate der Gelfiltration, wobei E1 die Fraktion B6 bezeichnet. Die Benennung der anderen Spuren erfolgte analog: E2 → C1, E3 → C2, E4 → C4, E5 → C6, E6 → C7.

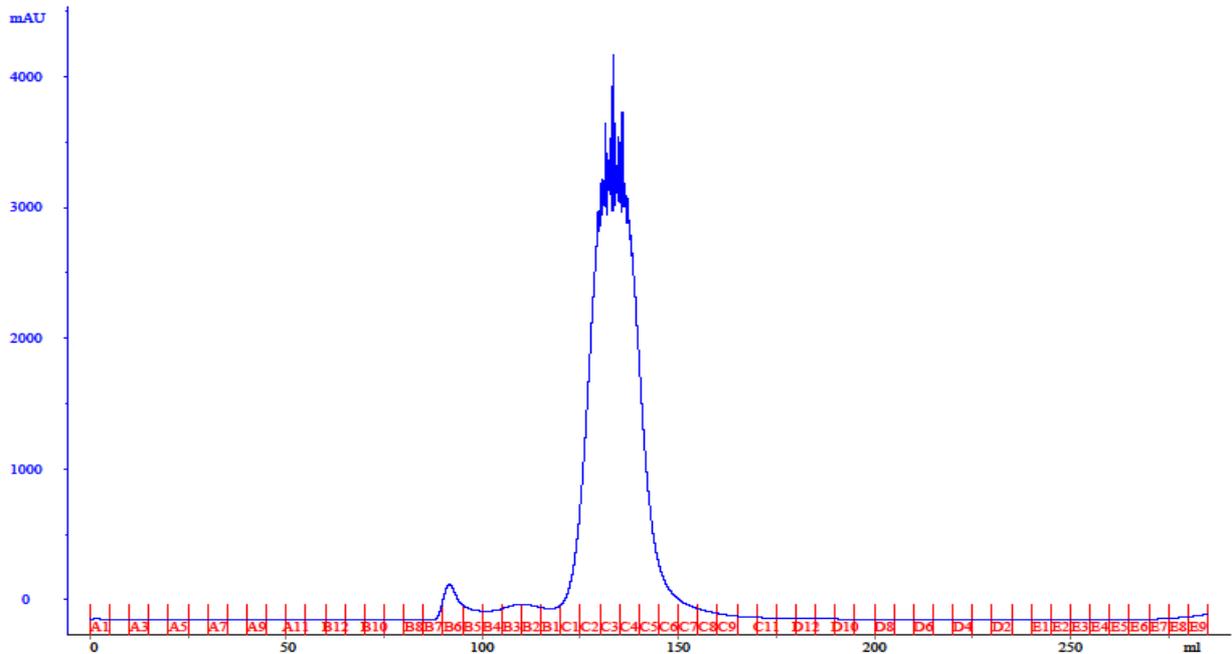


Abbildung 4.4: Dargestellt ist das Chromatogramm der Gelfiltration von 14-3-3 γ . Der Hauptpeak repräsentiert dabei das geschnittene Protein. Die Elution des Proteins erfolgte in den Fraktionen C1 bis C7.

Abbildung 4.3 zeigt deutlich einen Größenunterschied zwischen ungeschnittenem und geschnittenem 14-3-3 γ auf den Bahnen Unges. (etwa 34 kDa) und Ges. (ca. 29 kDa), wodurch eine erfolgreiche Abspaltung des His-Tags durch die TEV-Protease nachgewiesen ist. Die einzelne Bande auf der Bahn „Ges.“ unterstreicht zudem die Tatsache, dass die Protease das komplette Protein geschnitten hat. Wäre das 14-3-3 Protein nicht vollständig geschnitten worden, würden Mehrfachbanden zu sehen sein.

Auf der Bahn E1, welche die Fraktion B6 aus dem Absorptionsspektrum bezeichnet, ist eine schwache, aber für das Protein spezifische Bande bei 29 kDa lokalisiert. Die Elution des Proteins beginnt also an dieser Stelle. Da sich keine weiteren deutlichen Proteinbanden erkennen lassen, veranschaulicht dies, dass sich bereits keine Verunreinigungen mehr auf der Säule befunden haben. In den fünf nachfolgenden Spuren E2 bis E6 ist die Bande des 14-3-3 Proteins bei 29 kDa deutlich sichtbar. Diese Fraktionen stammen alle aus dem Absorptionspeak und weisen lediglich unterschiedliche Konzentrationen auf. Dabei stimmt die intensivste Bande (auf Bahn E4) mit dem Maximum des Absorptionsspektrums überein.

Das eluierte Protein aus allen Fraktionen wurde abschließend auf 1 mL mit einer Konzentration von 37,86 mg/mL aufkonzentriert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

4.2.2. 14-3-3 ϵ Mutante

Die Aufreinigung der 14-3-3 ϵ Mutante erfolgte analog zu der von 14-3-3 γ . Gezeigt ist nur das SDS-Gelbild nach dem TEV-Verdau und der Gelfiltration.

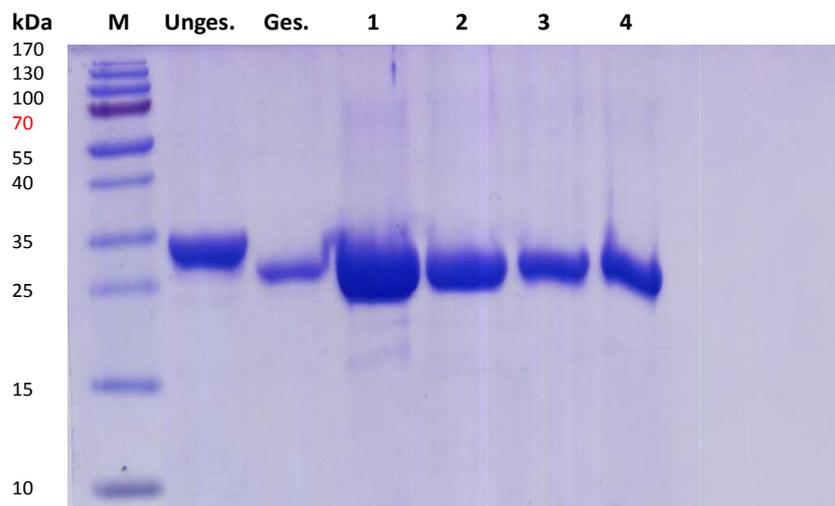


Abbildung 4.5: Die Abbildung zeigt das SDS-Gel nach der Gelfiltration von 14-3-3 ϵ . Bahn M: Marker Page Ruler, Prestained Protein Ladder, Fermentas®, Bahn Unges.: ungeschnittenes Protein, Bahn Ges.: geschnittenes Protein nach dem TEV-Verdau. Die weiteren vier Spuren 1-4 bilden eine Verdünnungsreihe des 14-3-3 ϵ Proteins nach der Gelfiltration und Aufkonzentrierung ab.

Auch bei dieser Isoform lässt sich an Hand von Abbildung 4.5 feststellen, dass der His-Tag erfolgreich vom Protein abgespalten wurde, was sich durch den Bandenshift zwischen Bahn 2 (Unges.) und Bahn 3 (Ges.) bemerkbar macht. Des Weiteren liegt 14-3-3 ϵ in reiner Form vor, da keine unspezifischen Proteinbanden erkennbar sind.

14-3-3 ϵ wurde auf eine Endkonzentration von 32,78 mg/mL bei einem Volumen von etwa 1 mL aufkonzentriert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

4.3. Kristallisation der Binärkomplexe

Die Cystein-modifizierten 14-3-3 Proteine wurden nach der Aufreinigung für die Co-Kristallisation mit dem TRESKe Peptid KCNK 18 (Sequenz siehe 3.1.1.) verwendet, TRESKpS wurde hingegen mit den Originalsequenzen der 14-3-3 Proteine co-kristallisiert. Bei der Komplexierung sollte durch die Modifikation eine Disulfidbrücke zwischen Protein und Peptid ausgebildet werden, welche zur Stabilisierung des Komplexes beiträgt. Folgende Komplexlösungen wurden für die Kristallisation angesetzt: 14-3-3 γ Δ C original mit TRpS und 14-3-3 γ G174C Δ C mit TRe, 14-3-3 ϵ original Δ C mit TRpS und 14-3-3 ϵ G172C Δ c mit TRe und 14-3-3 η Δ C original mit TRpS. TRpS bezeichnet dabei eine 16 Aminosäuren lange Sequenz aus dem intrazellulären Loop von TRESK mit einem phosphorylierten Serin an Position 252. Bei TRe wurde das Phosphoserin gegen ein Glutamat ausgetauscht. Mittels der Dampfdiffusionsmethode konnten bei dem Initialscreen alle angesetzten Komplexe bei verschiedenen Bedingungen erfolgreich auskristallisiert werden. Bei der Optimierung dieser Bedingungen durch Variation des pH-Wertes und der Präzipitantienkonzentration konnten die Kristalle aller hergestellten Komplexierungsansätze reproduzierbar gezüchtet werden.

Aufgrund der mangelnden Streueigenschaften der Kristalle (etwa 7-8 Å) bei internen Messungen im Max-Planck-Institut konnten für die meisten der oben genannten Komplexansätze jedoch bislang keine verwertbaren Datensätze aufgenommen werden, um daraus die Kristallstrukturen lösen zu können. Für den Komplex 14-3-3 η Δ C ohne Mutation mit TRpS konnte ein Datensatz aufgenommen werden, der aufgrund der Datenqualität allerdings nicht ausgewertet werden konnte.

4.3.1. 14-3-3 σ Δ C Mutante (G171C) mit TRpS und TRe

Kristalle des Binärkomplexes von 14-3-3 σ Δ C G171C mit TRpS und TRe wurden bereits im Vorfeld dieser Arbeit durch Mitglieder der Arbeitsgruppe Ottmann erzeugt und deren Datensätze aufgenommen. Diese wurden im Rahmen der Arbeit ausgewertet, sodass die Kristallstrukturen der beiden Komplexe gelöst werden konnten.

14-3-3 σ Δ C Mutante mit TRpS:

Abbildung 4.6 zeigt die Kristallstruktur der 14-3-3 σ Δ C Mutante (G171C) mit TRpS, welche bei einer Auflösung von 1,7 Å aufgenommen und über molekularen Ersatz gelöst wurde (kristallographische Daten im Anhang).

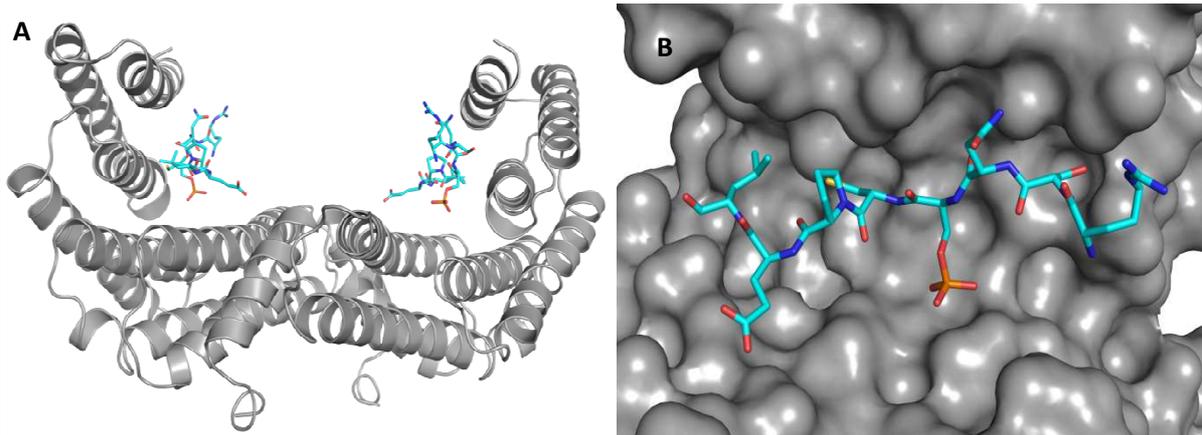


Abbildung 4.6: Darstellung des Komplexes 14-3-3 σ Δ C G171C mit TRESKpS (abgebildete Sequenz: RSN(pS)CPEL). A) Die Abbildung zeigt ein 14-3-3 σ Dimer (dargestellt in grau), in den Bindegrotes ist das Peptid TRESKpS in türkis gezeigt. B) Hier veranschaulicht ist die Detailansicht des amphipatischen Bindegrotes eines Monomers als Oberflächendarstellung (ebenfalls in grau, Peptid in türkis).

Die Abbildung 4.6 macht deutlich, dass das Peptid über den N-Terminus im mode I - Bindemotiv an 14-3-3 σ Δ C G171C bindet und in der amphipatischen Bindegrotes liegt. Über welche Aminosäurereste TRESKpS im Bindegrotes koordiniert wird, wird in der nachfolgenden Darstellung gezeigt.

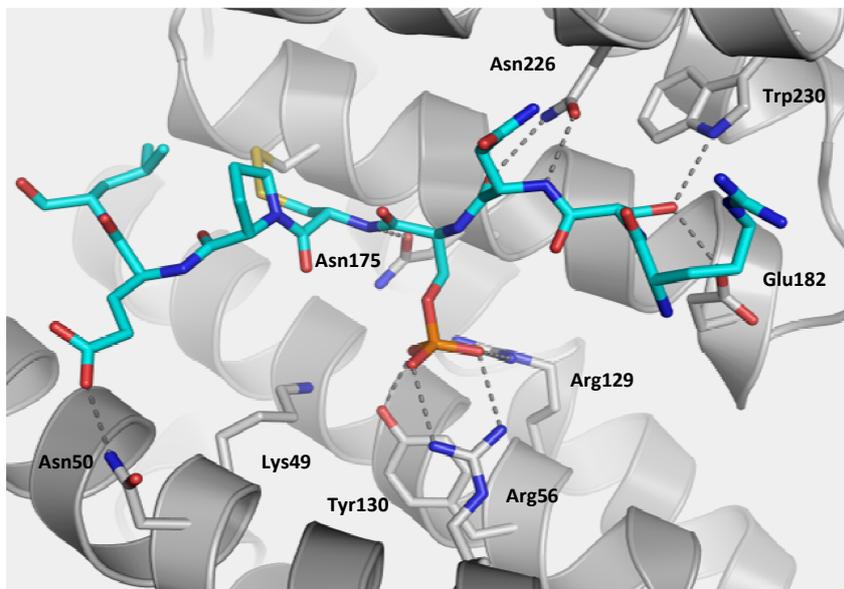


Abbildung 4.7: Gezeigt ist sowohl die Phosphatkoordination des mode I Peptids TRESKpS KCNK 18 (in türkis, Sequenz siehe Abb. 4.6) durch ein 14-3-3 σ Monomer als auch deren Wasserstoffbrückenbindungen und die Disulfidbrücke (in gelb).

An der Struktur (Abb. 4.7) ist zu erkennen, dass das Peptid über Wechselwirkungen zwischen dem Phosphoserin und den Resten Arg56, Arg129 und Tyr130 koordiniert wird. Lys49 trägt in diesem Fall nicht zur Bindung bei. In der Abbildung ist jedoch nur die wahrscheinlichste Ausrichtung gezeigt, welche die Lysin-Position aus der ermittelten Elektronendichte widerspiegelt. Wäre Lysin anders ausgerichtet, wäre eine Phosphatkoordination daher auch denkbar. An Hand dieser Kristallstruktur und aufgrund der hohen Sequenzhomologien der 14-3-3 Isoformen untereinander lässt sich bereits vermuten, dass auch die anderen Isoformen β , γ , ϵ , η , τ und ζ das phosphorylierte TRESK in ihrem Bindegang binden. Dies wurde zumindest für 14-3-3 γ , ϵ und η bereits durch Kristallisationsexperimente nachgewiesen.

Der N-Terminus von TRESKpS wird über insgesamt vier Wasserstoffbrückenbindungen vom Protein gebunden. Zwei H-Brücken werden zwischen dem Peptidrückgrat (Hydroxylgruppe und Stickstoff) und Asn226 ausgebildet, eine weitere kommt vom Trp230 und die vierte Wasserstoffbrücke stammt von Glu182. Eine weitere H-Brücke zum Stickstoff des Peptidrückgrats wird von dem Proteinrest Asn175 ausgebildet. Am C-Terminus wird das Peptid ebenfalls über eine H-Brücke koordiniert, welche zwischen dem vom Peptid kommenden Glutamat und dem vom Protein stammenden Asn50 gebildet wird.

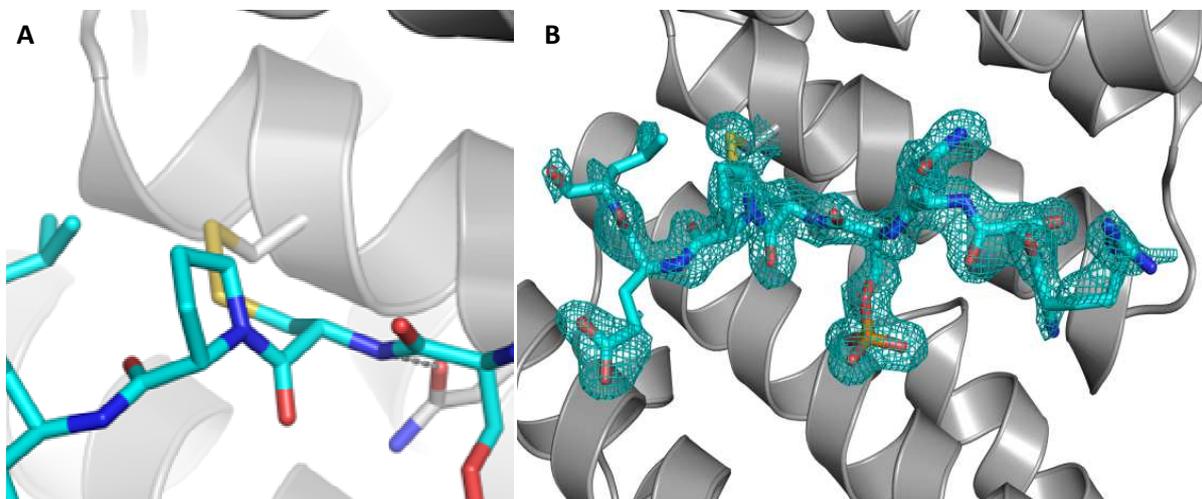


Abbildung 4.8: A) In gelb dargestellt ist die Disulfidbrücke zwischen TRESKpS und der 14-3-3 σ Mutante (G171C) (maximaler Abstand zwischen den C $_{\beta}$ -Atomen: 4 Å). B) Abbildung B zeigt die gemessene 2F $_o$ -F $_c$ Elektronendichte, skaliert auf 1 σ , von TRESKpS, welche deutlich die Ausbildung einer Disulfidbrücke darstellt.

Die Abbildung 4.8 A weist deutlich auf, dass die Disulfidbrücke zwischen dem Cystein-modifizierten Protein und dem Peptid erfolgreich eingeführt werden konnte, was zur Stabilisierung des Komplexes beiträgt. Auch in Darstellung 4.8 B lässt sich das Vorhandensein einer Disulfidbrücke an Hand der gemessenen $2F_0-F_c$ Elektronendichte nachweisen. Zudem wird durch die Elektronendichte bestätigt, dass die phosphorylierte TRESK-Sequenz an dieser Stelle im 14-3-3 Bindekanal bindet. An Hand der Elektronendichte lässt sich bei einer Detaildarstellung der Cystein-Region (siehe Abbildung 4.9) allerdings auch beobachten, dass das Cystein des Peptids zwei mögliche Ausrichtungen (Konformationen) einnehmen kann. Entweder findet wie bereits in Abbildung 4.8 gezeigt eine Ausbildung der Disulfidbrücke zum Cystein des 14-3-3 Proteins statt oder, bei einer anderen Orientierung, gibt es keine Bindung. Dies ist möglicherweise auf die zu große Entfernung zwischen den beiden C_β -Atomen der Cysteine zurückzuführen, welche für die Ausbildung einer Disulfidbrücke einen maximalen Abstand von 4 Å haben dürfen. Liegen sie weiter voneinander entfernt, können die Reste keine kovalente Bindung eingehen. Da der Abstand der C_β -Atome in der gezeigten Struktur jedoch 3,75 Å beträgt, wird der Grund für das Ausbleiben dieser Disulfidbrücke die reduzierenden Bedingungen innerhalb des Cytosols sein. Unter diesen Gegebenheiten wird die kovalente Bindung zu zwei Thiolgruppen reduziert.

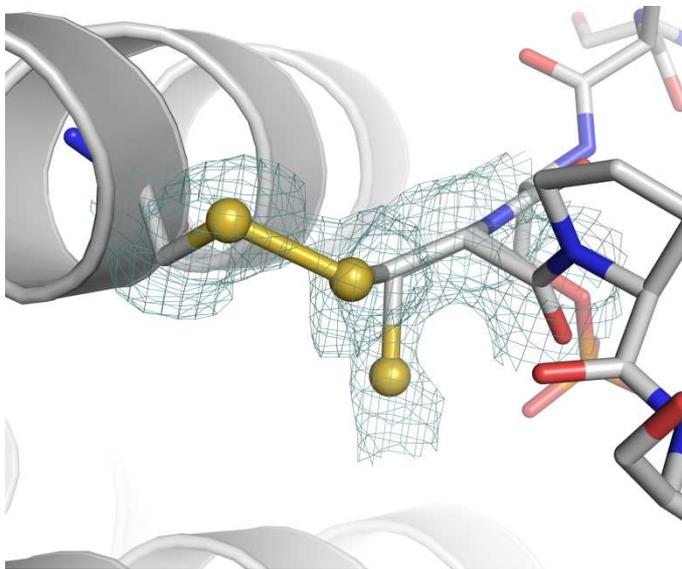


Abbildung 4.9: Detaildarstellung der $2F_0-F_c$ Elektronendichte von 14-3-3 σ G171C, skaliert auf 1σ , und der zwischen dem 14-3-3 Protein und TRESKpS Peptid ausgebildeten Disulfidbrücke.

14-3-3 σ Δ C Mutante mit TRe:

Bislang wurde vermutet, dass Glutamat in vielen Strukturen ein phosphoryliertes Serin oder Threonin ersetzen kann, selten jedoch als Phosphomimikri fungiert. Oft reichen die Wechselwirkungen des Glutamats mit dem Protein aber nicht aus, um die Phosphat-Wechselwirkungen zu ersetzen. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit eine zur zusätzlichen Stabilisierung des Komplexes wichtige Disulfidbrücke eingeführt. Dies sollte dazu dienen, zu überprüfen, ob die Wechselwirkungen des Cysteins und Glutamats ausreichen, um das Phosphat zu ersetzen. Wie sich nachfolgend zeigt, ist die Disulfidbrücke in Kombination mit dem Glutamat ausreichend stabil, um eine Bindung zum 14-3-3 Protein auszubilden. Anstelle des phosphorylierten Serins trägt diese Sequenz also ein Glutamat an entsprechender Position.

Die Struktur dieses binären Komplexes, welche ebenfalls mittels molekularem Ersatz bei einer Auflösung von 1,45 Å gelöst wurde, ist in Abbildung 4.10 dargestellt. Die kristallographischen Daten dazu befinden sich im Anhang.

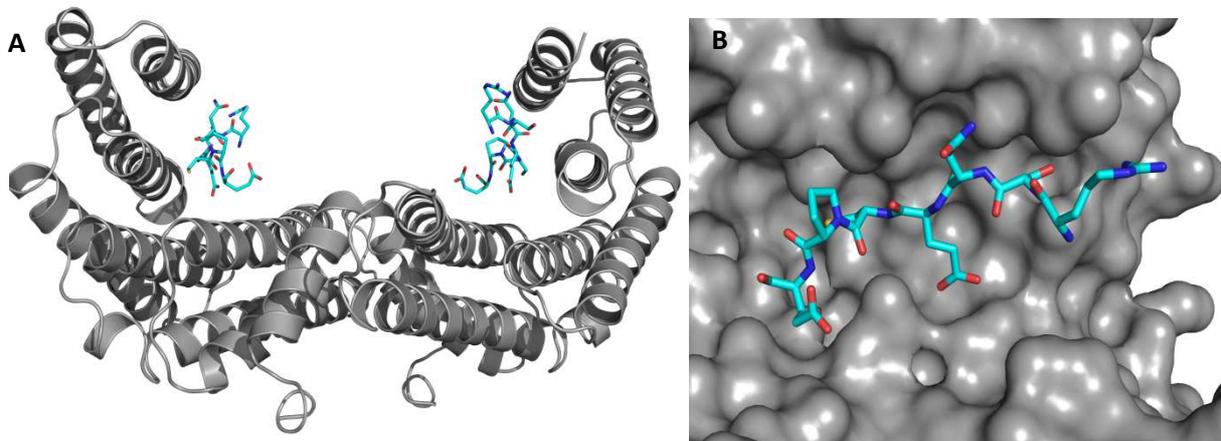


Abbildung 4.10: Die Abbildung zeigt den Komplex 14-3-3 σ Δ C Mutante (G171C) mit TRESKe (abgebildete Sequenz: RSN(E)CPE). A) Dargestellt ist ein 14-3-3 σ Dimer (in grau), das Peptid in türkis bindet im amphipatischen Bindekanal. B) In Grafik B ist die Oberflächendarstellung des Bindekanals veranschaulicht (ebenfalls in grau, Peptid in türkis).

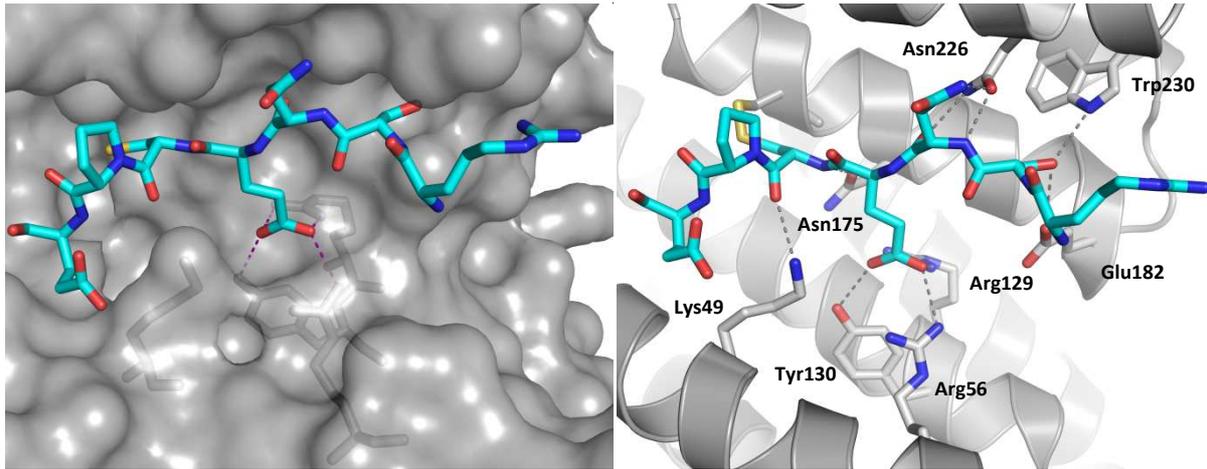


Abbildung 4.11: Gezeigt sind die Polarkontakte zwischen 14-3-3 σ G171C und TRESKe (Sequenz siehe Abb. 4.10) sowohl in Oberflächen- als auch in Cartoondarstellung. Die Farbverteilung wurde analog zu Abb. 4.10 gewählt.

TRESKe wird auf eine zum phosphorylierten Peptid vergleichbare Weise, durch Wasserstoffbrückenbindungen von Arg56, Arg129 und Tyr130, von dem 14-3-3 Protein koordiniert. Bei dieser Struktur werden die Bindungen alternativ zum Phosphat zum hier vorhandenen Glutamat ausgebildet, wodurch das Glutamat in eine zum Phosphat vergleichbare Position gebracht wird. Arg56 baut hier im Gegensatz zur Phosphatkoordinierung allerdings eine H-Brücke weniger zum Peptid auf, woraus sich schließen lässt, dass die Affinität zum TRESKe-Peptid geringer ist als die zum TRESKpS-Peptid. Möglicherweise ist die fehlende Wasserstoffbrücke darauf zurückzuführen, dass Glutamat einen H-Brückendonator und einen -akzeptor aufweist, wohingegen Phosphat drei Wasserstoffdonatoren besitzt. Der Rest Lys49 ist nicht an der Koordinierung des Glutamats beteiligt, sondern baut stattdessen eine H-Brücke zur Carbonylgruppe des Peptidrückgrats auf. An Hand dieser Struktur wird deutlich, dass nicht immer ein Phosphat für eine 14-3-3 Protein-Protein-Interaktion notwendig ist.

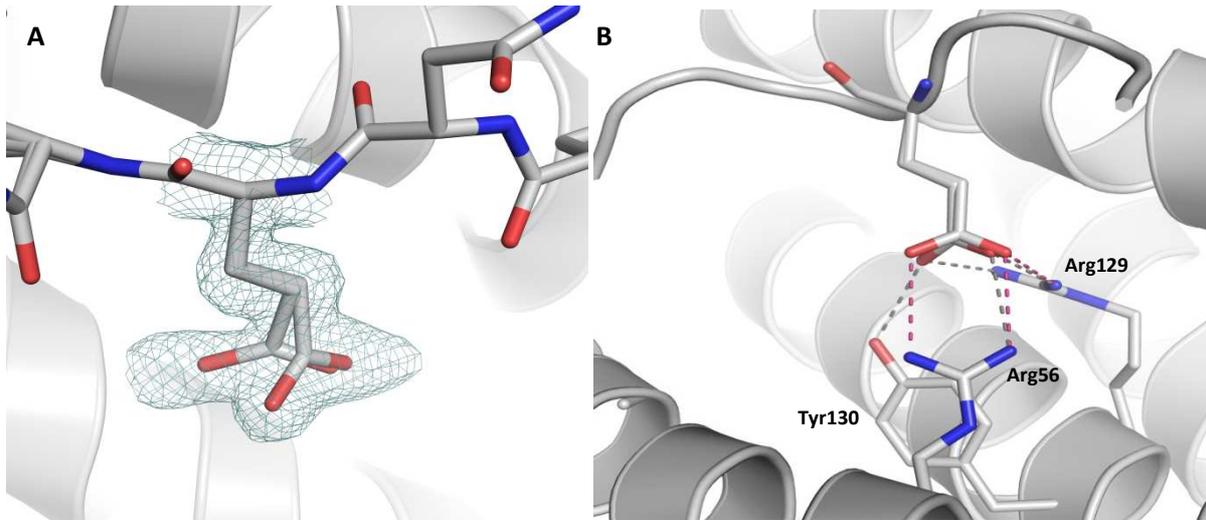


Abbildung 4.12: A) Die Abbildung zeigt das Glutamat in zwei verschiedenen Ausrichtungen, welche aufgrund der gemessenen $2F_o-F_c$ Elektronendichte, skaliert auf 1σ , beide möglich sind. B) Die Änderungen der Polarkontakte aufgrund der verschiedenen Glu-Koordinationen sind durch unterschiedliche Farbgebungen dargestellt.

In Abbildung 4.12 A ist die gemessene $2F_o-F_c$ Elektronendichte für Glutamat dargestellt, an Hand derer festzustellen ist, dass es im Unterschied zur Phosphatkoordinierung zwei mögliche Ausrichtungen für Glu gibt. Die Phosphatgruppe im phosphorylierten Peptid nimmt hingegen nur eine Konformation ein. Darstellung 4.12 B zeigt die Auswirkungen dieser unterschiedlichen Orientierungen. In der einen Position wird Glutamat durch Wasserstoffbrückenbindungen der Reste Arg56, Arg129 und Tyr130 koordiniert (die polaren Kontakte sind in grau gezeichnet). Bei der zweiten Ausrichtungsmöglichkeit sind hingegen nur die beiden Arginin-Reste an der Glu-Koordinierung beteiligt. Dabei bildet Arg56 zwei H-Brücken und Arg129 nur eine Wasserstoffbrücke zum Glutamat aus (in magenta dargestellt).

Die Koordination des Peptidrückgrats findet analog zum 14-3-3 σ Δ C Mutante-TRpS-Komplex über die Reste Asn226, Trp230, Asn175 und Glu182 statt. Des Weiteren konnte auch hier die Ausbildung einer Disulfidbrücke beobachtet werden, welche zur Stabilisierung des Komplexes führt (siehe Abbildung 4.13).

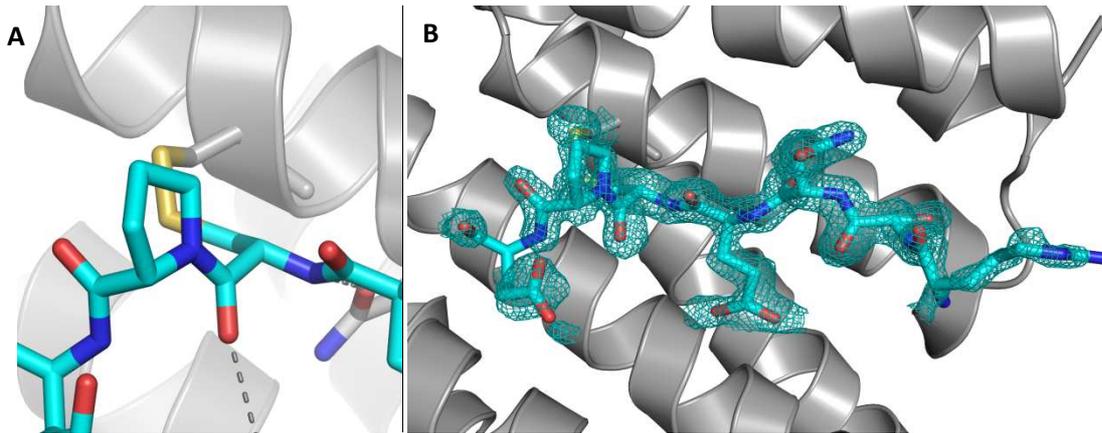


Abbildung 4.13: A) Stickdarstellung des an 14-3-3 σ G171C gebundenen TRESKe Peptids. Die Disulfidbrücke zwischen TRESKe und der 14-3-3 σ Mutante ist in gelb abgebildet. B) In türkis dargestellt ist das von 14-3-3 koordinierte Peptid TRESKE sowie dessen gemessene 2F_O-F_C Elektronendichte, skaliert auf 1 σ .

In der nachfolgenden Abbildung 4.14 (siehe nächste Seite) ist an Hand der gemessenen 2F_O-F_C Elektronendichte im Detail dargestellt, dass die an der Disulfidbrücke beteiligten Cysteine verschiedene Konformationen einnehmen können.

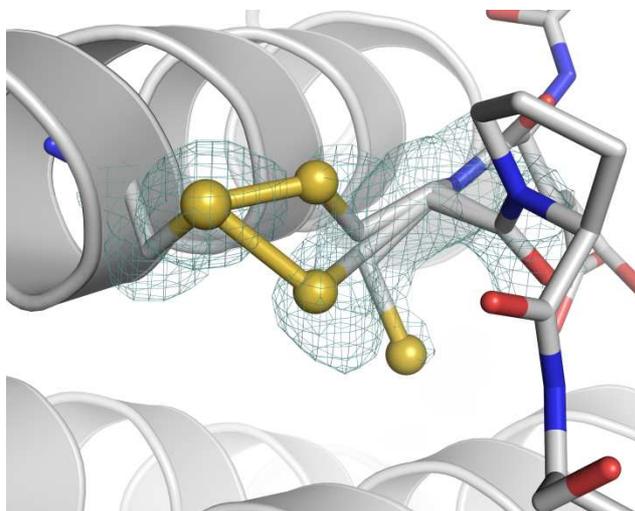


Abbildung 4.14: Gezeigt sind drei verschiedene Ausrichtungen der Cysteine, die an der Disulfidbrücke beteiligt sind, sowie deren gemessene 2F_O-F_C Elektronendichte, skaliert auf 1 σ . Bei zwei Konformationen kommt es zur Ausbildung einer Disulfidbrücke, bei einer dritten Ausrichtungsmöglichkeit hingegen nicht.

Die Abbildung 4.14 demonstriert, dass die Cysteine, welche an der Ausbildung der Disulfidbrücke beteiligt sind, ebenfalls verschiedene Ausrichtungen einnehmen können. Durch die gemessene $2F_o - F_c$ Elektronendichte (in türkis dargestellt) wird dies bestätigt. Vermutlich liegt das TRESKe-Peptid aufgrund des Phosphatersatzes durch Glutamat etwas lockerer in der Bindegrube, wodurch mehr Peptid-Bewegungen stattfinden. Cystein hat demnach auch einen etwas größeren Bewegungsspielraum und kann andere Konformationen in der Disulfidbrücke einnehmen. Es ist denkbar, dass die unterschiedlichen Ausrichtungen Einfluss auf die Stabilität des Komplexes nehmen können, da einige Konformationen aufgrund ihrer Bindungswinkel anderen gegenüber bevorzugt sind. Sowohl die Bindungswinkel als auch die Bindungslängen der in dieser Arbeit beschriebenen Strukturen befinden sich in den für die Ausbildung der Disulfidbrücke erlaubten Bereichen.

Eine weitere Beobachtung ist, dass das Cystein durch eine andere Orientierung nicht in der Lage ist, überhaupt eine Disulfidbrücke auszubilden. Auch diese Möglichkeit ist in Abbildung 4.14 dargestellt. Zu erklären ist das Ausbleiben der Bindung möglicherweise durch eine zu große Entfernung zwischen den beiden Cysteinen (größer als 4 Å) oder aber, viel wahrscheinlicher, durch reduzierende Umgebungsbedingungen, welche dazu führen, dass die Cysteine der Disulfidbrücke zu Thiolgruppen reduziert werden. In diesem Fall wird die Stabilität des Komplexes negativ beeinflusst.

4.4. Fluoreszenz-Polarisations-Assays

In der Fachliteratur wurden die Bindungsaffinitäten zwischen den 14-3-3 Isoformen und dem Kaliumkanal TRESK KCNK 18 bislang nicht beschrieben. Zur Aufklärung dieser wurden daher Fluoreszenz-Polarisations-Assays (FP-Assays) durchgeführt, die zur Ermittlung der Dissoziationskonstante K_d dienen.

Für den Assay wurden TRESK-Peptide der Sequenzen AMERSNSCPELVL und XPPQAMERSNSCPELVL verwendet. Hierbei sollte überprüft werden, ob das um die drei Aminosäuren Pro, Pro, Glu verkürzte Peptid ähnliche Affinitäten aufweist wie das Peptid der Originalsequenz, um daraus Rückschlüsse über die an der Bindung beteiligten Aminosäuren ziehen zu können.

Alle Messungen wurden dreifach als Triplikat-Bestimmungen durchgeführt, sodass die Ergebnisse unabhängig voneinander gewonnen und Zufallswerte vermieden werden konnten.

Für den FP-Assay wurde das Peptid im FP-Puffer (1x, Zusammensetzung siehe 3.1.5.) auf eine Konzentration von 100 nM verdünnt. Die 14-3-3 Isoformen wurden zu der Suspension titriert und die 384-well-Platten anschließend im Infinite500-Reader gemessen.

Durch nicht-lineare Regression der ermittelten Anisotropie-Werte konnten die K_d -Werte für die Isoformen nach folgendem Modell („One Site Total“ im Programm GraphPad Prism)

$$Y = \frac{B_{max} \cdot X}{(K_d + X)} + NS \cdot X + Background$$

berechnet werden und ergeben sich zu (siehe Tabelle 4.1, nächste Seite):

Tabelle 4.1: K_d -Werte der FP-Assays, Angaben in μM .

14-3-3 β	14-3-3 γ	14-3-3 ϵ	14-3-3 η	14-3-3 σ	14-3-3 τ	14-3-3 ζ
K_d Mittelwerte Peptid 1 in μM						
0,879 \pm 0,697	0,121 \pm 0,029	2,776 \pm 1,412	0,416 \pm 0,079	18,537 \pm 2,270	0,331 \pm 0,126	0,460 \pm 0,233
K_d Mittelwerte Peptid 2 in μM						
0,394 \pm 0,146	0,043 \pm 0,035	4,773 \pm 1,290	0,164 \pm 0,044	11,317 \pm 6,117	0,668 \pm 0,181	0,480 \pm 0,182

Das Peptid 1 bezeichnet dabei die um drei Aminosäuren verkürzte TRESK-Sequenz FAM (Carboxyfluorescein)-AMERSNpSCPELVL mit einem Phosphoserin. Unter Peptid 2 ist die originale Sequenz FAM-XPPQAMERSNpSCPELVL, die ebenfalls mit einem phosphorylierten Serin versehen ist, zu verstehen. Das X in der Sequenz bezeichnet dabei einen Ahx (6-aminohexanoic acid) Linker zwischen dem Peptid und der für die FP-Messung notwendigen FAM-Markierung, welche für die Markierung von Nukleotiden zuständig ist.

Die zugehörigen Graphen sind in Abbildung 4.15 und 4.16 dargestellt.

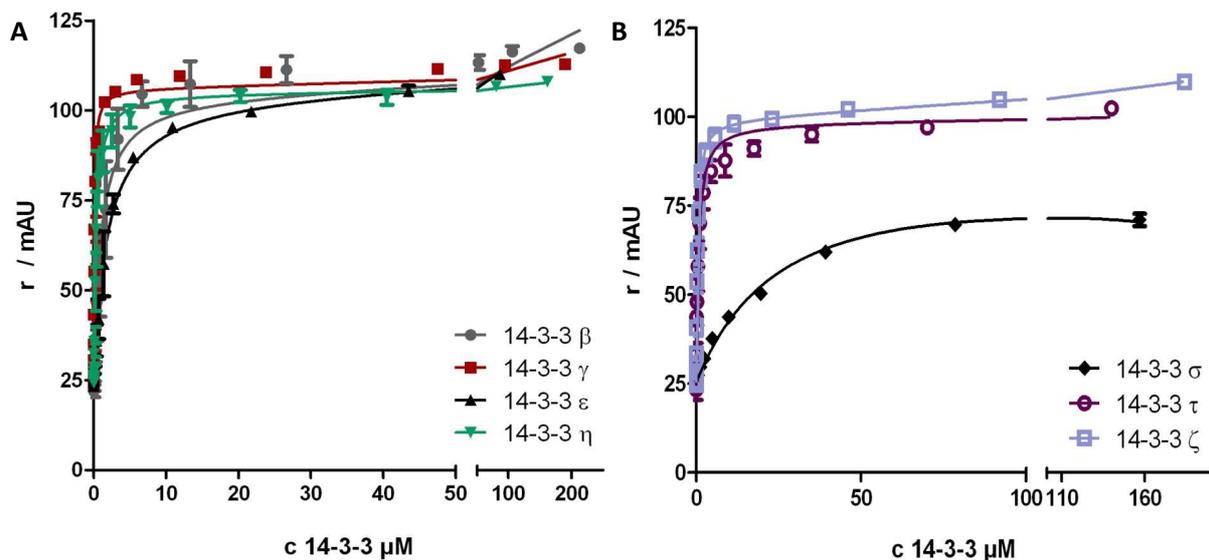


Abbildung 4.15: Veranschaulichung der gemessenen Bindungsaffinitäten des TRESK-Peptids mit der Sequenz AMERSNSCPVL an die 14-3-3 Isoformen A) β , γ , ϵ und η , B) σ , τ und ζ .

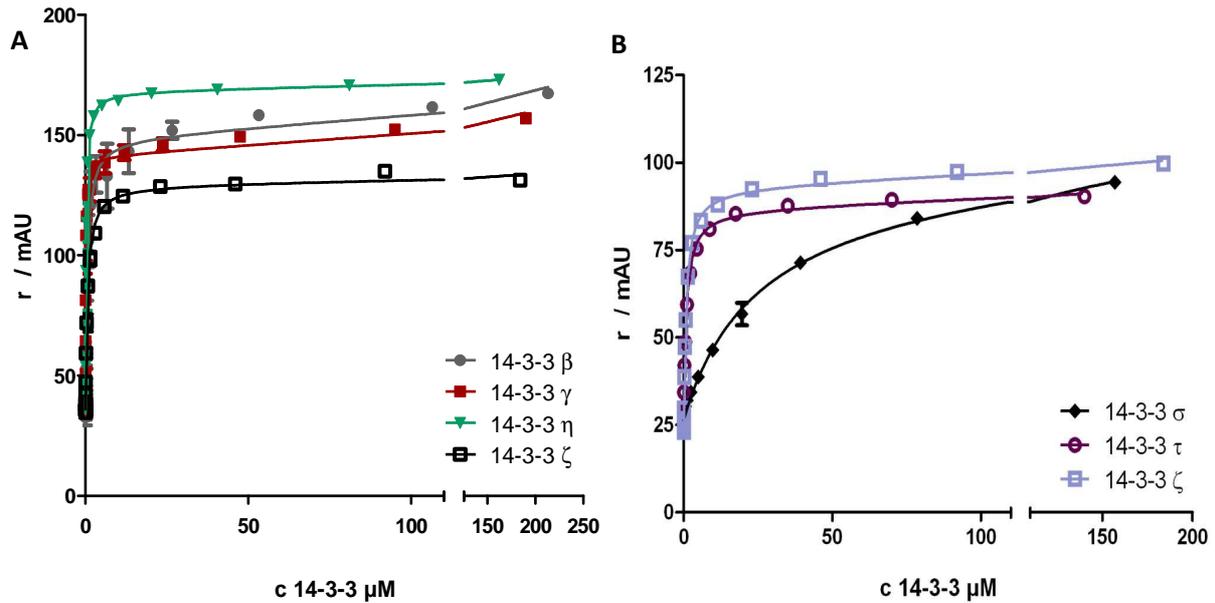


Abbildung 4.16: Veranschaulichung der gemessenen K_d -Werte des TRESK-Peptids mit der Sequenz XPPQAMERSNSCPVL an die 14-3-3 Isoformen A) β , γ , ϵ und η , B) σ , τ und ζ .

Sowohl an Hand der mittels nicht-linearer Regression ermittelten Werte, die in Tabelle 4.1 dargestellt sind, als auch von Abbildung 4.15 und 4.16 lässt sich feststellen, dass die 14-3-3 Proteine eine recht hohe Affinität zu den TRESK-Peptiden aufweisen. Begründet wird diese Aussage dadurch, dass die K_d -Werte zwischen dem nanomolaren und niedrigen mikromolaren Bereich liegen.

Des Weiteren stellt sich an Hand der K_d -Werte heraus, dass die TRESK-Peptide teilweise unterschiedlich stark gebunden werden. Das zeigt, dass eine Isoformspezifität vorliegt. Dies steht entgegen der Erwartung, dass alle 14-3-3 Isoformen eine nahezu gleich hohe Affinität zu den Peptiden aufweisen. Während die Dissoziationskonstanten für β , γ , η , τ und ζ etwa gleich sind, weichen die K_d -Werte von 14-3-3 ϵ und vor allem von 14-3-3 σ davon ab. Deutlich zu erkennen ist, dass 14-3-3 σ die niedrigste Affinität zu beiden Peptiden aufweist, was sich an den K_d -Werten zwischen 11 μM für Peptid 2 und etwa 18 μM für Peptid 1 bemerkbar macht. Auch in den Abbildungen 4.15 und 4.16 wird dies klar. Trotzdem wurden für diese Isoform, allerdings nur in mutierter Form, mit TRESKpS und TRESKe Kristalle mit sehr hohem Streuvermögen gezüchtet und deren Strukturen gelöst. Möglicherweise spielt die durch Cystein-Modifikation eingeführte Disulfidbrücke hierbei eine Rolle, da der Komplex durch die kovalente Bindung zusätzlich stabilisiert wird und erst nach Einführung dieser Disulfidbrücke Kristalle erhalten werden konnten.

Die K_d -Werte von 14-3-3 ϵ liegen mit Werten zwischen 2,7 μM (Peptid 1) und 4,7 μM (Peptid 2) bereits deutlich unter den Dissoziationskonstanten von 14-3-3 σ , sind aber dennoch um ein Vielfaches

höher als die Werte der verbleibenden Isoformen. Auffällig an den bei ϵ ermittelten Werten ist auch der Unterschied zwischen der Peptid-Sequenz AMERSNSCPELVL und der Sequenz XPPQAMERSNSCPELVL des zweiten Peptids, welches mit einer etwa 2-fach schlechteren Affinität gebunden wird als das um drei Aminosäuren verkürzte TRESK-Peptid 1. Die Isoform τ weist die gleiche Präferenz auf, wohingegen die vier Proteinisoformen β , γ , η und σ eine höhere Affinität zu der Originalsequenz des Kaliumkanals (Peptid 2) zeigen. Diese Präferenz lässt sich auch für die Isoform σ an Hand des Kurvenverlaufs in den Abbildungen 4.15 B und 4.16 B erkennen. Für 14-3-3 ζ ist eine nahezu vergleichbare Affinität zu beiden Peptiden zu verzeichnen. Diese Beobachtungen lassen die Schlussfolgerung zu, dass die drei Aminosäuren Pro, Pro und Gln (in der Sequenz PPQ) keine bedeutende Rolle bei der Ausbildung der Bindung zwischen dem 14-3-3 Protein und dem TRESK-Kanal tragen. Die Bindung wird sehr wahrscheinlich über andere Aminosäuren der Peptid-Sequenz vermittelt, welche näher am phosphorylierten Serin liegen. Auch der Ahx Linker oder die FAM-Markierung selbst beeinflussen die Affinitäten zwischen dem 14-3-3 Protein und den TRESK-Peptiden offensichtlich nicht.

An den Graphen aus Abbildung 4.15 und 4.16 ist zusätzlich zu erkennen, dass der aus Messdaten gezeichnete Kurvenverlauf nahezu aller 14-3-3 Isoformen (bis auf 14-3-3 σ) in eine Sättigung übergeht. Dies bedeutet, dass eine ausreichend hohe 14-3-3 Proteinkonzentration erreicht wird beziehungsweise ist, um das gesamte vorliegende Peptid zu binden. Das maximale Fluoreszenz-Signal ist erreicht und die Reaktion ist gesättigt.

4.5. Herstellung einer TRESK KCNK 18 Mutante durch Ortsspezifische Mutagenese

Die Bindung des TRESK-Peptids zum 14-3-3 Protein in Kombination mit Cystein und Glutamat konnte bereits nachgewiesen werden (siehe 4.3.). Als nächstes soll versucht werden, auch den intrazellulären Loop von TRESK in die 14-3-3 Kristallstruktur einzubringen. Dafür wurde der Loop mit den folgenden Aminosäuren modifiziert: das phosphorylierte Serin an der Aminosäureposition 252 wurden gegen ein Aspartat (Asparaginsäure) beziehungsweise ein Glutamat (Glutaminsäure) ausgetauscht. Diese weisen aufgrund der Säurefunktionen eine Strukturähnlichkeit zum Phosphat des Phosphoserins auf.

Die Einführung der Mutation erfolgte durch ortsspezifische Mutagenese und wurde analog zu 4.1. durchgeführt. Das Verifizieren positiver Sequenzierungs-Ergebnisse lief ebenfalls über Sequenz-Alignment ab; das Resultat ist nachstehend dargelegt. In den Reihen „1“ ist jeweils die Aminosäuresequenz des mutierten Polypeptids gezeigt, die Reihen „2“ dokumentieren die Sequenz des Originalpolypeptids.

TRESK KCNK 18 S252D Mutante:

```

1 -----MTDTGDILATILSTSYNRFKFPFFTRPLLSKW 63
2 YIYPVTRLGKYLCLMLYALFGIPLMFLVLTDTGDILATILSTSYNRFKFPFFTRPLLSKW 180
   : *****

1 CPKSLFKKKPDPKPADEAVPQIIISAEELPGPKLGTCPSPSCSMELFERSHALEKQNTL 123
2 CPKSLFKKKPDPKPADEAVPQIIISAEELPGPKLGTCPSPSCSMELFERSHALEKQNTL 240
   *****

1 QLPPQAMERSND CPELVLGRLSYSIISNLDEVGQOVER----- 161
2 QLPPQAMERSNS CPELVLGRLSYSIISNLDEVGQOVERLDIPLPIIALIVFAYISCAAAI 300
   *****

1 -----
2 LPFWETQLDFENAFYFCVTLTTIGFGDTVLEHPNFFLFFSIYIIVGMEIVFIAFKLVQN 360

```

Die Auswertung der Daten erfolgte ebenfalls mit den unter 4.1. genannten Online-Tools.

Genau wie das Aspartat weist auch das Glutamat strukturelle Ähnlichkeiten zum Phosphat des phosphorylierten Serins auf, weshalb auch diese Mutation einen interessanten Ansatzpunkt für weitere Kristallisationsexperimente liefert. Die ortsspezifische Mutagenese der S252E Mutante war allerdings bislang trotz verschiedener Elongationszeiten bei der PCR und mehrfachem DpnI-Verdau nicht erfolgreich. Diese Tatsache ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass ein Austausch von

drei Basen in der DNA-Sequenz des Peptids für eine positiv eingeführte Mutation nötig, aber sehr schwierig ist. Der Versuch, ein Glutamat anstelle des Serins an Aminosäureposition 252 einzufügen, soll im Anschluss an diese Arbeit wiederholt werden.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Mutationen bei den drei 14-3-3 Isoformen γ , ϵ und τ mittels ortsspezifischer Mutagenese eingeführt werden. Die Einführung von Cysteinen als „künstliche Stabilisatoren“ der Protein-Protein-Wechselwirkungen stellt eine nützliche und vielversprechende Methode dar, um die Interaktionen zu beeinflussen. Sie ermöglicht die Knüpfung einer kovalenten Bindung zwischen dem Protein und einem ebenfalls Cystein-modifizierten Protein oder Peptid wie TRESK und eignet sich insbesondere, um eine sonst für die Bindung nötige Phosphorylierung zu umgehen. Wird dies möglich, können auch andere 14-3-3 Partnerproteine gebunden werden. Dadurch können nicht nur deren Strukturen ermittelt sondern auch vielseitige Assays entwickelt werden. Aus diesen strukturellen Daten eines Komplexes zwischen einem 14-3-3 Protein und einem Partner können entscheidende Informationen gewonnen werden, um Wirkstoffe zu entwickeln, welche die Wechselwirkungen beider Proteine modulieren können.

Bisher wurden nur die Mutanten der Isoformen γ und ϵ exprimiert und aufgereinigt. Daher gilt die Expression von 14-3-3 τ als nächstes Ziel, um auch dies mit dem TRESK-Peptid co-kristallisieren und weitere Isoformen bezüglich ihrer Bindungsaffinitäten zum Peptid untereinander vergleichen zu können.

Die Struktur der Mutanten 14-3-3 σ G171C konnte sowohl mit TRESKpS KCNK 18 als auch mit TRESKe aufgeklärt werden. Das Peptid bindet in den Kanal des 14-3-3 Proteins, wobei Wechselwirkungen außerhalb des Kanals vernachlässigt werden. Da die Mutanten von 14-3-3 γ und ϵ sowie deren Originalformen bereits mit TRESKe beziehungsweise TRESKpS co-kristallisiert wurden, bislang aber keine verwertbaren Datensätze aufgenommen werden konnten (die im MPI erreichte Auflösung war für eine Aufklärung der Struktur nicht ausreichend), sollen diese als nächstes optimiert werden. Im Anschluss daran können deren Strukturen gelöst werden. Es soll überprüft werden, wie bei diesen Isoformen die Bindung entsteht und ob bei den Mutanten ebenfalls eine Disulfidbrücke ausgebildet wird. Auch von 14-3-3 η (Originalsequenz) wurden bereits Kristalle mit TRESKpS gezüchtet, die weiter optimiert werden sollen, um eine bessere Auflösung zu erreichen.

Weiterhin interessant ist die Co-Kristallisation der verbleibenden 14-3-3 Isoformen (β , τ und ζ) und auch deren Mutanten mit dem TRESKpS- und TRESKe-Peptid, um Vergleiche zwischen den einzelnen Isoformen ziehen zu können. Zusätzlich soll das 14-3-3 Protein mit dem vollständigen intrazellulären Loop von TRESK KCNK 18 kristallisiert werden, um zu überprüfen, ob auch hier Komplexbildungen stattfinden und um ein komplettes Bild der Protein-Protein-Interaktion zu erhalten. Die Kristallisation längerer Konstrukte mit 14-3-3 Proteinen stellt allerdings eine Herausforderung dar, da diese bislang nicht etabliert ist.

Mit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten TRESK S252D Mutante können ebenfalls oben beschriebene Kristallisationsexperimente durchgeführt werden.

Die ortsspezifische Mutation S252E in TRESK konnte im Gegensatz zur S252D Mutante bislang nicht erfolgreich eingeführt werden, was im Anschluss an diese Arbeit wiederholt werden soll.

Um die Bindungsaffinitäten zwischen Protein und TRESKpS KCNK 18 (zwei Sequenzen verschiedener Länge) aufzuklären und damit die Ergebnisse der Strukturauflösungen zu stützen, wurden Fluoreszenz-Polarisations Assays durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Isoformen β , γ und η die höchsten Affinitäten zu beiden Peptiden aufwiesen. Diese besitzen Affinitätswerte im nanomolaren Bereich. 14-3-3 σ wies hingegen nur sehr schlechte/schwache K_d -Werte auf, obwohl für diese Isoform bereits Kristalle des Binärkomplexes mit dem Peptid gezüchtet und deren Struktur gelöst werden konnten. Genau wie bei den Kristallisationsexperimenten wäre auch hier ein Assay mit der vollständigen Sequenz des intrazellulären TRESK-Loops interessant.

Im Hinblick auf die Entwicklung möglicher Stabilisatoren oder Inhibitoren der Wechselwirkungen zwischen Protein und Peptid für den Einsatz in einem FP-Assay ist die Kenntnis der Struktur zwischen dem 14-3-3 Protein und dem intrazellulären TRESK-Loop von zentraler Bedeutung. Liegen diese Kristallstrukturen vor, so können verschiedene in silico-Methoden (bspw. Molecular Modelling) dazu verwendet werden, um solche Substanzen zu identifizieren. Gerade bei den 14-3-3 Isoformen β , γ und η wäre der Einsatz solcher Substanzen aufgrund der Ergebnisse aus den FP-Messungen interessant. Mit Hilfe dieser kleinen Moleküle kann der FP-Assay auf einen Kompetitions-Assay ausgeweitet werden und die IC_{50} -Werte ermittelt werden.

Die Kontrolle und Beeinflussung des Kaliumkanals durch die Wechselwirkung mit Proteinen wie den 14-3-3 Proteinen stellt also eine vielversprechende Möglichkeit dar, um die Zellen- und Muskelerregbarkeit, die Reizweiterleitung und vor allem die durch TRESK KCNK 18 vermittelte Schmerzwahrnehmung zu kontrollieren. So können besonders für Migräne-Patienten, die sich meist auf eine Mutation in der Sequenz von TRESK zurückführen lässt, mögliche therapeutische Fortschritte erlangt werden.

6. Literatur

- Aitken, A. (2006). 14-3-3 proteins: a historic overview. *Seminars in cancer biology*, 16(3), 162-72. doi:10.1016/j.semcancer.2006.03.005
- Andres-Enguix, I., Shang, L., Stansfeld, P. J., Morahan, J. M., Sansom, M. S. P., Lafrenière, R. G., Roy, B., et al. (2012). Functional analysis of missense variants in the TRESK (KCNK18) K channel. *Scientific reports*, 2, 237. doi:10.1038/srep00237
- Coblitz, B., Shikano, S., Wu, M., Gabelli, S. B., Cockrell, L. M., Spieker, M., Hanyu, Y., et al. (2005). C-terminal recognition by 14-3-3 proteins for surface expression of membrane receptors. *The Journal of biological chemistry*, 280(43), 36263-72. doi:10.1074/jbc.M507559200
- Czirják, G., & Enyedi, P. (2010). TRESK background K(+) channel is inhibited by phosphorylation via two distinct pathways. *The Journal of biological chemistry*, 285(19), 14549-57. doi:10.1074/jbc.M110.102020
- Czirják, G., Tóth, Z. E., & Enyedi, P. (2004). The two-pore domain K⁺ channel, TRESK, is activated by the cytoplasmic calcium signal through calcineurin. *The Journal of biological chemistry*, 279(18), 18550-8. doi:10.1074/jbc.M312229200
- Czirják, G., Vuity, D., & Enyedi, P. (2008). Phosphorylation-dependent binding of 14-3-3 proteins controls TRESK regulation. *The Journal of biological chemistry*, 283(23), 15672-80. doi:10.1074/jbc.M800712200
- Dixit, V. M. (1996). 14-3-3 Proteins Associate with A20 in an Isoform-specific Manner and Function Both as Chaperone and Adapter Molecules. *Journal of Biological Chemistry*, 271(33), 20029-20034. doi:10.1074/jbc.271.33.20029
- Enyedi, P., Braun, G., & Czirják, G. (2012). TRESK: the lone ranger of two-pore domain potassium channels. *Molecular and cellular endocrinology*, 353(1-2), 75-81. doi:10.1016/j.mce.2011.11.009
- 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>
- Fu, H., Subramanian, R. R., & Masters, S. C. (2000). 14-3-3 Proteins: Structure, Function, and Regulation. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 40, 617-47. doi:10.1146/annurev.pharmtox.40.1.617
- G. Moore BW, Perez VJ, G. M. (1968). Assay and regional distribution of a soluble protein characteristic of the nervous system. (Vol. 1968, pp. 265-272).
- 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
- Goldstein, S. A., Bockenhauer, D., O'Kelly, I., & Zilberberg, N. (2001). Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits. *Nature reviews. Neuroscience*, 2(3), 175-84. doi:10.1038/35058574

- Hermeking, H. (2003). The 14-3-3 cancer connection. *Nature reviews. Cancer*, 3(12), 931-43. doi:10.1038/nrc1230
- Huber, S. C., MacKintosh, C., & Kaiser, W. M. (2002). Metabolic enzymes as targets for 14-3-3 proteins. *Plant molecular biology*, 50(6), 1053-63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12516872>
- Jones, D. H., Ley, S., & Aitken, A. (1995). Isoforms of 14-3-3 protein can form homo- and heterodimers in vivo and in vitro: implications for function as adapter proteins. *FEBS Letters*, 368(1), 55-58. doi:10.1016/0014-5793(95)00598-4
- Lesage, F., Reyes, R., Fink, M., Duprat, F., Guillemare, E., & Lazdunski, M. (1996). Dimerization of TWIK-1 K⁺ channel subunits via a disulfide bridge. *The EMBO journal*, 15(23), 6400-7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=452465&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Lesage, Florian, & Lazdunski, M. (2000). Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol*, 279(5), F793-801. Retrieved from <http://ajrenal.physiology.org/cgi/content/abstract/279/5/F793>
- Mackintosh, C. (2004). Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes. *The Biochemical journal*, 381(Pt 2), 329-42. doi:10.1042/BJ20031332
- 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
- Ottmann, C., Marco, S., Jaspert, N., Marcon, C., Schauer, N., Weyand, M., Vandermeeren, C., et al. (2007). Structure of a 14-3-3 coordinated hexamer of the plant plasma membrane H⁺-ATPase by combining X-ray crystallography and electron cryomicroscopy. *Molecular cell*, 25(3), 427-40. doi:10.1016/j.molcel.2006.12.017
- Ottmann, C., Yasmin, L., Weyand, M., Veessenmeyer, 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. *The EMBO journal*, 26(3), 902-13. doi:10.1038/sj.emboj.7601530
- Patel, A. J., & Lazdunski, M. (2004). The 2P-domain K⁺ channels: role in apoptosis and tumorigenesis. *Pflügers Archiv: European journal of physiology*, 448(3), 261-73. doi:10.1007/s00424-004-1255-8
- Petosa, C. (1998). 14-3-3zeta Binds a Phosphorylated Raf Peptide and an Unphosphorylated Peptide via Its Conserved Amphipathic Groove. *Journal of Biological Chemistry*, 273(26), 16305-16310. doi:10.1074/jbc.273.26.16305
- Rahm, A.-K., Gierten, J., Kisselbach, J., Staudacher, I., Staudacher, K., Schweizer, P. a, Becker, R., et al. (2012). PKC-dependent activation of human K(2P) 18.1 K(+) channels. *British journal of pharmacology*, 166(2), 764-73. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01813.x
- Sano, Y., Inamura, K., Miyake, A., Mochizuki, S., Kitada, C., Yokoi, H., Nozawa, K., et al. (2003). A novel two-pore domain K⁺ channel, TRESK, is localized in the spinal cord. *The Journal of biological chemistry*, 278(30), 27406-12. doi:10.1074/jbc.M206810200

Schumacher, B., Mondry, J., Thiel, P., Weyand, M., & Ottmann, C. (2010). Structure of the p53 C-terminus bound to 14-3-3: implications for stabilization of the p53 tetramer. *FEBS letters*, *584*(8), 1443-8. doi:10.1016/j.febslet.2010.02.065

Yaffe, M. B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P. R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S. J., et al. (1997). for 14-3-3: Phosphopeptide Binding Specificity, *91*, 961-971.

Zhao, J., Meyerkord, C. L., Du, Y., Khuri, F. R., & Fu, H. (2011). 14-3-3 Proteins As Potential Therapeutic Targets. *Seminars in cell & developmental biology*, *22*(7), 705-12. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.semcdb.2011.09.012

7. Anhang

7.1. Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1	K_d -Werte der FP-Assays
Tabelle 7.1	Datensammlungs- und Verfeinerungsparameter für den Komplex 14-3-3 σ mit TRESKpS
Tabelle 7.2	Datensammlungs- und Verfeinerungsparameter für den Komplex 14-3-3 σ mit TRESKe

7.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	14-3-3 Dimer
Abbildung 1.2	14-3-3 Bindemotive
Abbildung 1.3	Struktureller Aufbau des Kaliumkanals TRESK
Abbildung 3.1	Fluoreszenz-Polarisation
Abbildung 3.2	Dampfdiffusionsmethode (sitting und hanging drop)
Abbildung 3.3	Beugungsmuster eines Kristalls
Abbildung 4.1	12%-iges Tris-Tricin-Gel der Aufreinigung von 14-3-3 γ über eine Co-NTA-Säule
Abbildung 4.2	Chromatogramm der Aufreinigung von 14-3-3 γ
Abbildung 4.3	12%-iges Tris-Tricin-Gel der Gelfiltration von 14-3-3 γ
Abbildung 4.4	Chromatogramm der Gelfiltration von 14-3-3 γ
Abbildung 4.5	12%-iges Tris-Tricin-Gel der Gelfiltration von 14-3-3 ϵ
Abbildung 4.6	A: 14-3-3 σ Dimer mit TRESKpS-Peptid, B: Oberflächendarstellung des Monomer-Bindekanals mit TRpS
Abbildung 4.7	Koordination des Peptids durch polare Kontakte
Abbildung 4.8	A: Disulfidbrücke zwischen TRpS und der 14-3-3 σ Mutante, B: Elektronendichte von TRESKpS
Abbildung 4.9	Verschiedene Ausrichtungen der an der Disulfidbrücke beteiligten Cysteine von TRpS
Abbildung 4.10	A: 14-3-3 σ Dimer mit TRESKe-Peptid, B: Oberflächendarstellung des Monomer-Bindekanals mit TRe
Abbildung 4.11	Polarkontakte zwischen Protein und Peptid sowohl in Oberflächen- als auch in Cartoondarstellung
Abbildung 4.12	Verschiedene mögliche Glu-Ausrichtungen sowie deren Auswirkungen auf die Peptidkoordinierung
Abbildung 4.13	A: Disulfidbrücke zwischen TRe und der 14-3-3 σ Mutante, B: gemessene $2F_o - F_c$ Elektronendichte von TRESKe

Abbildung 4.14	Verschiedene Ausrichtungen der an der Disulfidbrücke beteiligten Cysteine von TRe
Abbildung 4.15	Veranschaulichung der gemessenen Bindungsaffinitäten des TRESK-Peptids mit der Sequenz AMERSNSCELVL zu 14-3-3
Abbildung 4.16	Veranschaulichung der ermittelten K_d -Werte des TRESK-Peptids mit der Sequenz XPPQAMERSNSCELVL zu 14-3-3
Abbildung 7.1	Plasmidkarte des Vektors pProExHtb
Abbildung 7.2	Plasmidkarte des Vektors pET14b
Abbildung 7.3	Ramachandran-Plot der Kristallstruktur 14-3-3 σ Δ C Mutante mit TRpS
Abbildung 7.4	Ramachandran-Plot der Kristallstruktur 14-3-3 σ Δ C Mutante mit TRe

7.3. Vektorkarten

pProExHtb:

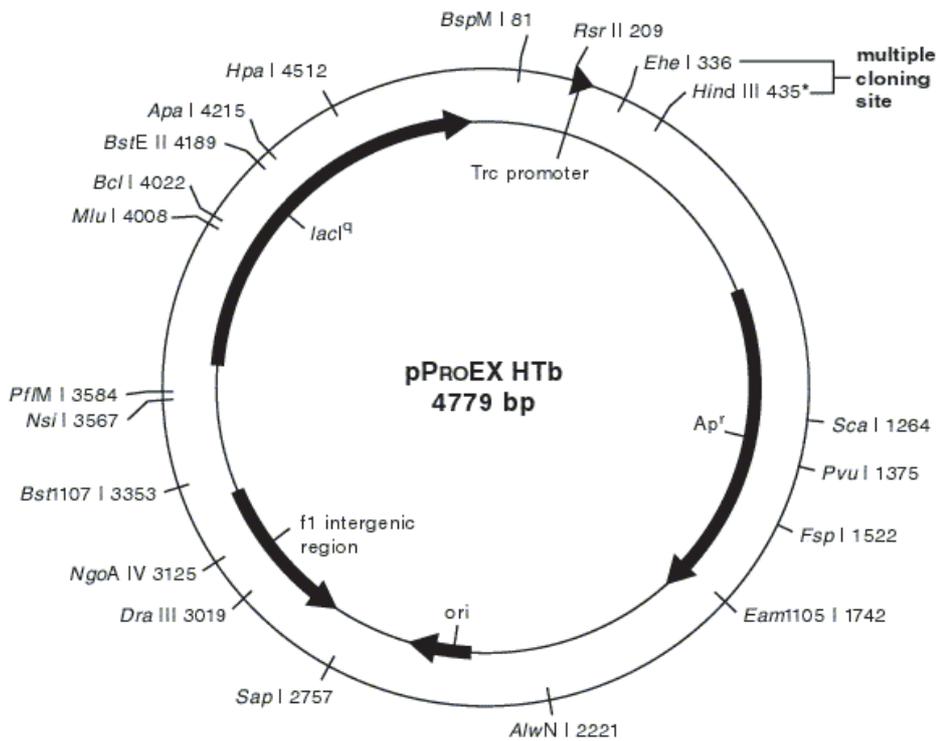


Abbildung 7.1: Plasmidkarte des Vektors pProExHtb
(Quelle: <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pproexhtb.pdf>)

pET14b:

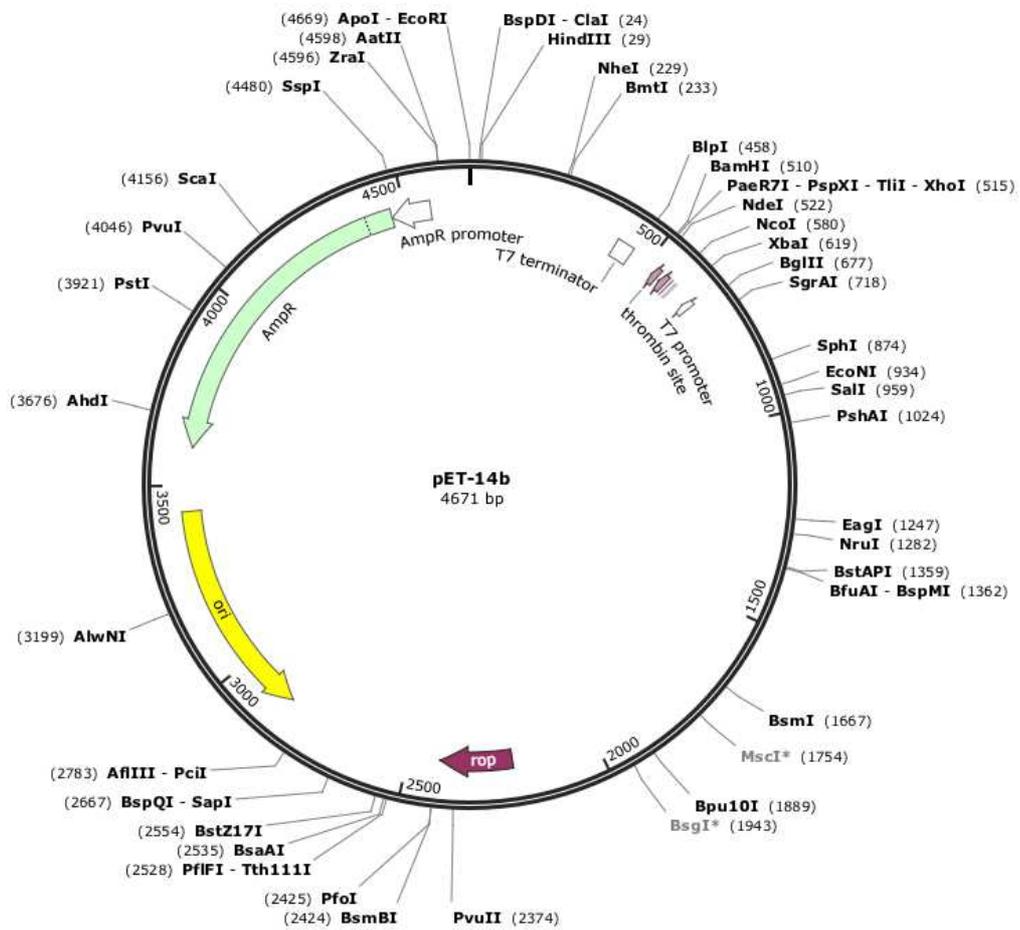


Abbildung 7.2: Plasmidkarte des Vektors pET14b (Quelle: http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/pet_vectors_%28novagen%29/pET-14b/)

7.4. Kristallographische Daten und Ramachandran-Plots der Kristallstrukturen

Tabelle 7.1: Datensammlungs- und Verfeinerungsparameter für den Komplex 14-3-3 σ G171C mit TRESKpS

Crystal data	
Space group	C222 ₁
Unit cell parameters (Å)	a = 84.01, b = 114.35, c = 63.99; $\alpha=\beta=\gamma$ (°) = 90
Data-processing statistics	
Resolution (Å)	42.64 – 1.73 (1.77 – 1.73)
No. of unique reflections	32049 (2333)
Redundancy	3.67 (3.79)
R _{merge} (%)	5.6 (19.9)
I/ σ (I)	17.84 (6,44)
Completeness	98.5(99.3)
Structure-refinement statistics	
Resolution (Å)	42.64 – 1.73 (1.77 – 1.73)
No. of reflections	32043 (2194)
R _{work} /R _{free}	0.1804/0.2135 (0.1820/0.2430)
Reflections in test set	1603
Atomic displacement model	isotropic
Model statistics	
Non-H atoms	2128
Average B factor (Å ²)	24.403
Geometry	
Rmsd bond length (Å)	0.031
Rmsd bond angle (°)	2.035
Ramachandran plot	
Most favoured region (%)	97.9
Allowed region (%)	2.1
Generously allowed and disallowed regions (%)	0.0

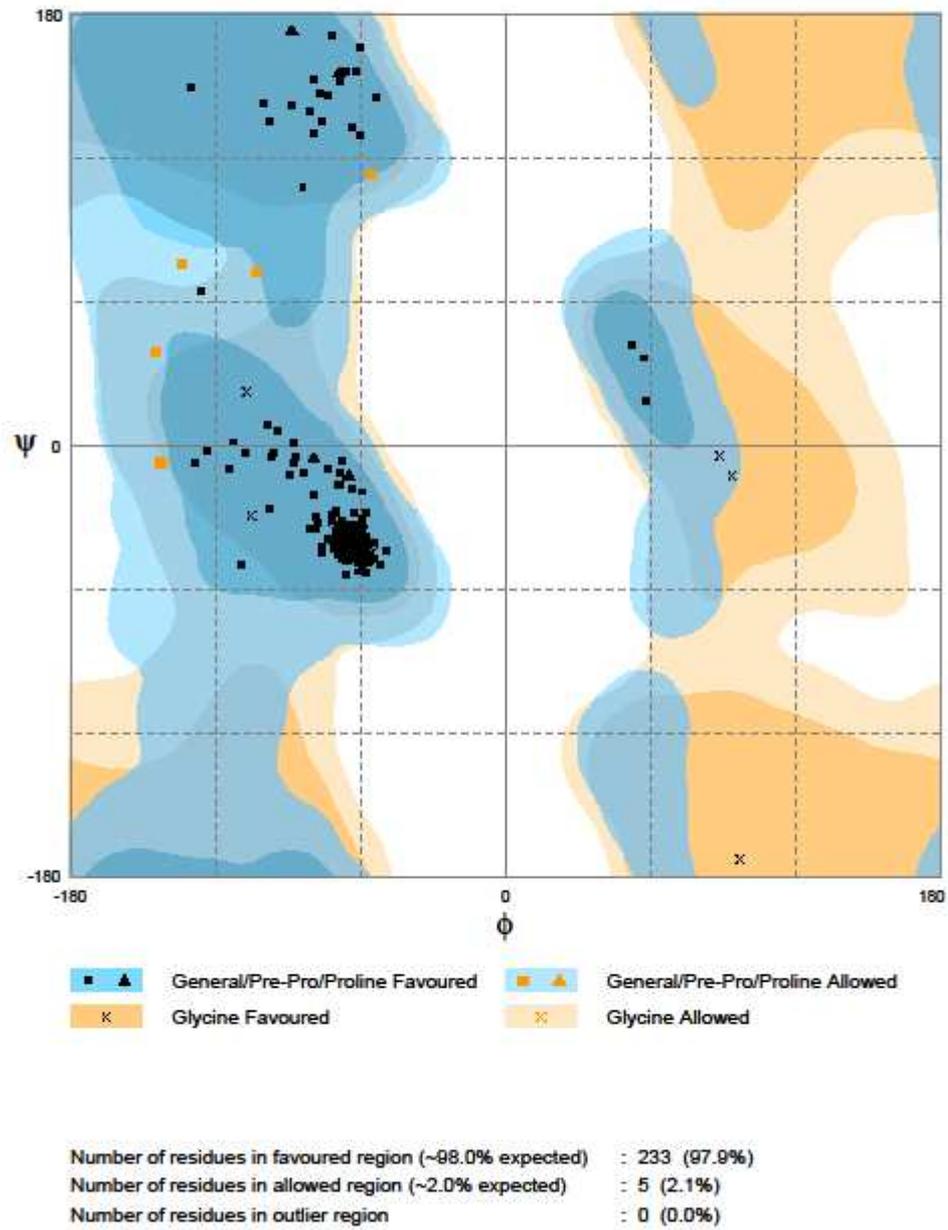


Abbildung 7.3: Ramachandran-Plot der Kristallstruktur 14-3-3 σ Δ C Mutante (G171C) mit TRpS

Tabelle 7.2: Datensammlungs- und Verfeinerungsparameter für den Komplex 14-3-3 σ G171C mit TRESKe**Crystal data**

Space group	C222 ₁
Unit cell parameters (Å)	a = 82.63, b = 112.07, c = 62.58; $\alpha = \beta = \gamma$ (°) = 90

Data-processing statistics

Resolution (Å)	41.75– 1.5 (1.60 – 1.50)
No. of unique reflections	46684 (8120)
Redundancy	5.91 (5.75)
R _{merge} (%)	5.4 (22.4)
I/ σ (I)	20.51 (6.04)
Completeness	99.6 (99.5)

Structure-refinement statistics

Resolution (Å)	41.75– 1.5 (1.54 – 1.50)
No. of reflections	44334 (3076)
R _{work} /R _{free}	0.177/0.193 (0.178/0.228)
Reflections in test set	2335
Atomic displacement model	isotropic

Model statistics

Non-H atoms	4372
Average B factor (Å ²)	18.54

Geometry

Rmsd bond length (Å)	0.028
Rmsd bond angle (°)	2.664

Ramachandran plot

Most favoured region (%)	97.03
Allowed region (%)	2.9
Generously allowed and disallowed regions (%)	0.0

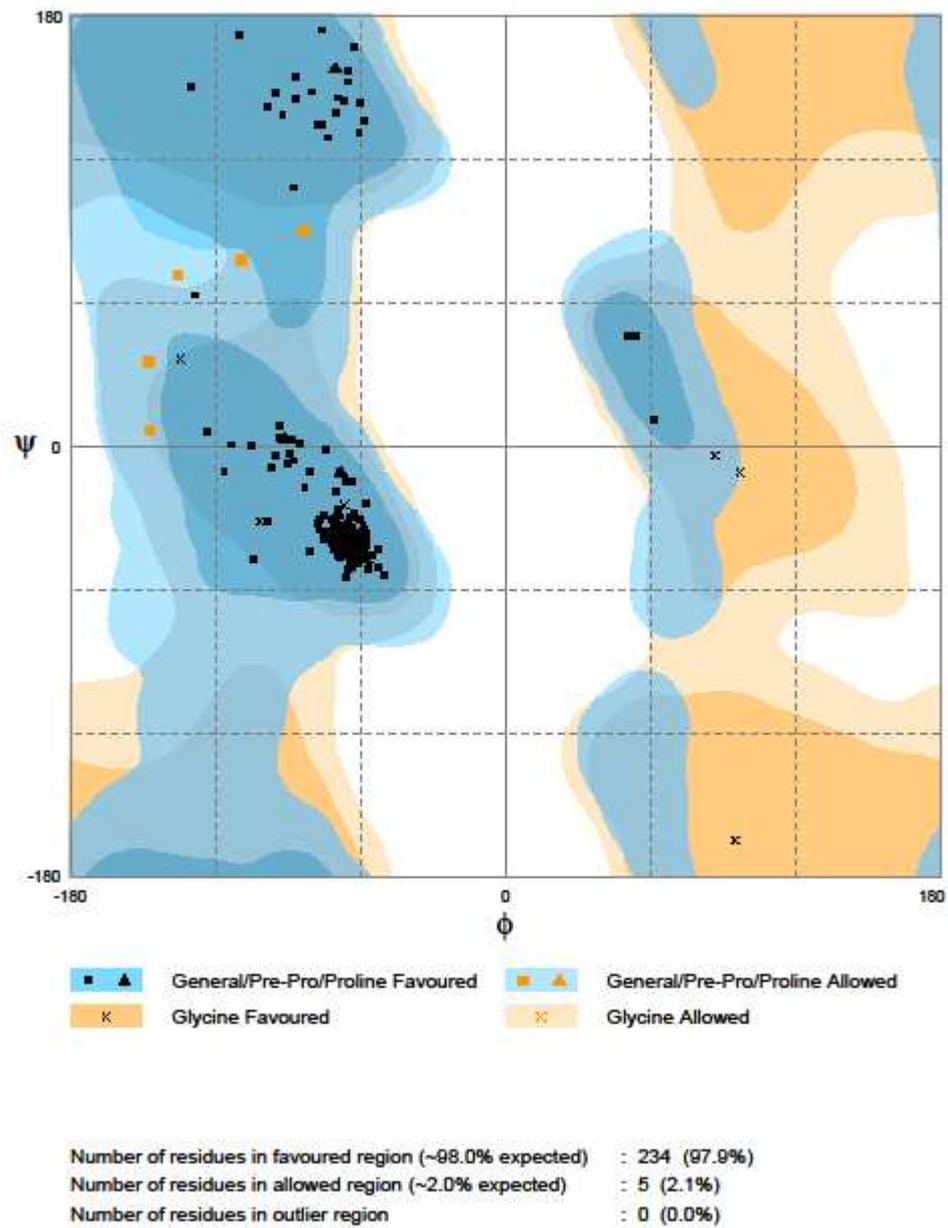


Abbildung 7.4: Ramachandran-Plot der Kristallstruktur 14-3-3 σ Δ C Mutante (G171C) mit TRe

Eidesstattliche Erklärung:

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Dortmund, den 10. August 2012

Philine Hagel