

Eine Mikroarray-Strategie zur Untersuchung der Substratspezifitäten von Protein-Tyrosin-Phosphatasen**

Maja Köhn, Marta Gutierrez-Rodriguez, Pascal Jonkheijm, Stefan Wetzel, Ron Wacker, Hendrik Schroeder, Heino Prinz, Christof M. Niemeyer, Rolf Breinbauer, Stefan E. Szedlacsek und Herbert Waldmann*

Durch reversible Phosphorylierung von Tyrosin-Resten in Proteinen werden zahlreiche zelluläre Prozesse reguliert, z. B. Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Zellzyklus, Signaltransduktion, Zelladhäsion und Immunantwort.^[1] Dabei wird die Phosphorylierung von Protein-Tyrosin-Kinasen (PTKs) und die Dephosphorylierung von Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) gesteuert. Anders als bei den bereits umfassend erforschten PTKs ist der Kenntnisstand in Bezug auf die Substratspezifitäten der PTPs noch immer niedrig.^[2] Solche Daten könnten für zahlreiche Anwendungen von Nutzen sein, wie die Synthese künstlicher Substrate für kinetische Studien^[3] und das Design von Inhibitoren,^[4] die vielversprechende Wirkstoffkandidaten sowie Hilfsmittel für die Erforschung von PTP-Signalwegen in Zellen sein können. Das Wissen um Substratspezifitäten kann sogar Hinweise für die

Identifizierung natürlicher Substrate liefern.^[5] Über peptidbasierte Ansätze zur Untersuchung von PTP-Substratspezifitäten wurde bereits berichtet.^[6]

Zur Detektion von Substraten wurden generell Versuche in Lösung durchgeführt,^[7] die jedoch oftmals nicht zur parallelen Hochdurchsatz-Untersuchung von zahlreichen Substratkandidaten geeignet sind. Mikroarray-Techniken ermöglichen das schnelle und effiziente Auslesen einer großen Zahl von Peptiden, was bereits bei der Untersuchung von Kinase-Substratspezifitäten demonstriert wurde.^[8] Zur Zuordnung von PTP-Substratspezifitäten kamen Mikroarrays hingegen bisher nur in sehr wenigen Fällen zum Einsatz.^[9]

Hier berichten wir über die Entwicklung von Phosphotyrosin(pTyr)-Peptid-Mikroarrays und ihre Anwendung zur Untersuchung der Substratspezifität von zwei prototypischen PTPs: PTP μ und PTP1B. Unsere Methode umfasst fünf Schritte (**A–E** in Abbildung 1): Zunächst wird eine pTyr-Peptid-Bibliothek an fester Phase synthetisiert (**A**). Die einzelnen pTyr-Peptide werden anschließend auf Glasoberflächen immobilisiert (**B, C**). Als Immobilisierungsreaktion nutzten wir^[10] die von Raines, Bertozzi et al. beschriebene chemoselektive Staudinger-Ligation eines Azids mit einem Phosphin.^[11] Die pTyr-Peptid-Mikroarrays werden anschließend mit einer Phosphatase inkubiert (**D**), gewaschen, mit einem fluoreszenzmarkierten Anti-pTyr-Antikörper behandelt^[12] und wiederum gewaschen (**E**). Gegenüber einem Mikroarray, der mit Puffer anstatt mit PTP inkubiert ist, weisen bevorzugte Substrate generell einen Signalrückgang oder kein Signal mehr auf, während eine unveränderte Signalintensität auf ein nicht bevorzugtes Substrat hinweist.

Zunächst wurde eine Bibliothek aus einem Tetrapeptid, einem Hexapeptid und 46 Pentapeptiden mit möglichst vielen verschiedenen Aminosäuren in den einzelnen Positionen synthetisiert (siehe Hintergrundinformationen, S. 1). Die Synthese folgte der von uns bereits beschriebenen Strategie^[10] unter Verwendung eines Sulfamylbutyryl-Ankers an einem polymeren Harz.^[12] Während des Abspaltens der Verbindungen vom Harz wird das Azid an einer Hexylgruppe eingeführt, wodurch die Immobilisierung im nachfolgenden Schritt möglich wird.

Die Anwendbarkeit des pTyr-Peptid-Mikroarrays wurde unter Verwendung von PTP1B getestet, einer bezüglich ihrer Substratspezifität ausführlich untersuchten PTP.^[3,6] Peptid **1**^[19] (Abbildung 2) ist ein bekanntes Substrat von PTP1B ($K_M = 3.2 \mu\text{M}$). Da PTP1B generell saure Aminosäureseitenketten bevorzugt,^[13] wurde Peptid **2**^[19] (Abbildung 2) aus der Bibliothek gewählt, um zu prüfen, ob **1** gegenüber **2** be-

[*] Dr. M. Köhn, Dr. M. Gutierrez-Rodriguez, Dr. P. Jonkheijm, Dipl.-Chem. S. Wetzel, Priv.-Doz. H. Prinz, Prof. R. Breinbauer, Prof. H. Waldmann
Abteilung für Chemische Biologie
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)
und
Fachbereich Chemie
Organische Chemie
Universität Dortmund
44227 Dortmund (Deutschland)
Fax: (+49) 231-133-2499
E-Mail: herbert.waldmann@mpi-dortmund.mpg.de
Dr. R. Wacker
Chimera Biotec GmbH
Emil-Figge-Straße 76a, 44227 Dortmund (Deutschland)
Dr. H. Schroeder, Prof. C. M. Niemeyer
Fachbereich Chemie
Biologisch-Chemische Mikrostrukturtechnik
Universität Dortmund
Otto-Hahn-Straße 6, 44227 Dortmund (Deutschland)
Prof. S. E. Szedlacsek
Abteilung für Enzymologie
Biochemisches Institut
Splaiul Independentei 296, 060031 Bukarest (Rumänien)

[**] Diese Arbeit wurde von der Max-Planck-Gesellschaft, dem Forschungsprogramm „Molekulare Grundlagen der Biowissenschaften“ der Universität Dortmund, dem Fonds der Chemischen Industrie und dem Zentrum für Angewandte Chemische Genomik finanziell unterstützt. P.J. dankt der Alexander-von-Humboldt-Stiftung, und S.W. dankt Novartis für ein Stipendium.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

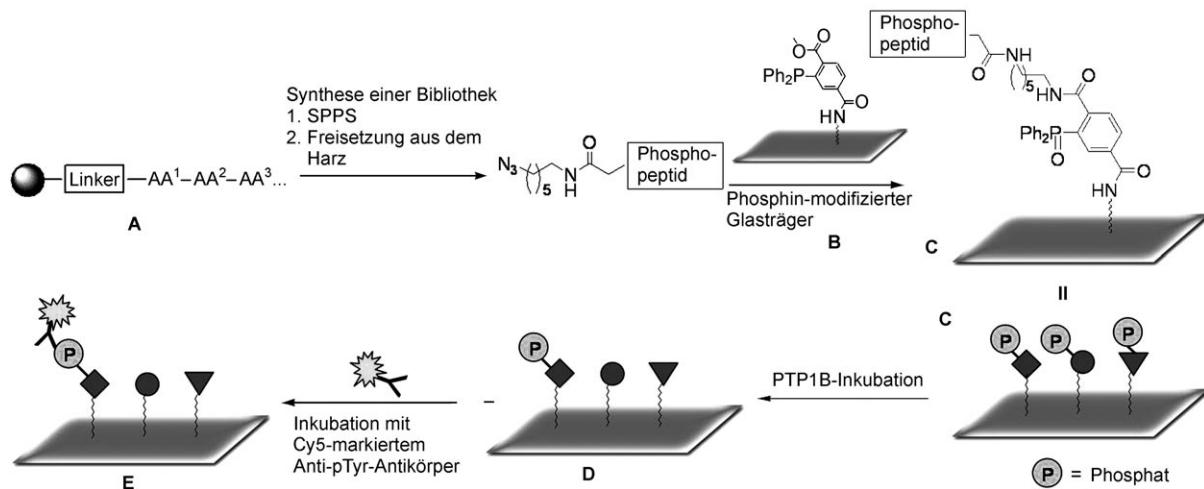


Abbildung 1. Konzept zur Herstellung und Anwendung von pTyr-Peptid-Mikroarrays (siehe Text für Details).

vorzugt dephosphoryliert wird. Die Substrate **1** und **2** wurden durch Spotting auf Phosphin-modifizierte Glasträger aufgetragen (1 mm, 250 pL/Spot).^[12] Die Phosphine waren auf einer Glasfläche immobilisiert, die mit Dendrimeren funktionalisiert war, um die Oberflächenbedeckung zu erhöhen.^[14] Um Wechselwirkungen von Peptiden und Phosphatase mit der Oberfläche zu minimieren, wurden zwei Aminohexyl-Linker eingeführt, einer zwischen den Dendrimeren und den Phosphinen und der andere zwischen den Peptiden und den Aziden.^[12] Inkubation der Arrays mit verschiedenen Konzentrationen von PTP1B und anschließende Behandlung mit einem Konjugat aus biotinyliertem Anti-pTyr-Antikörper und Cy5-markiertem Streptavidin (50 nm) ergab, dass beide Peptide von PTP1B dephosphoryliert werden (Abbildung 2). Für beide wurde ein Signalrückgang bei jeder Konzentrationserhöhung beobachtet; allerdings ist der Signalrückgang im Fall von **1** stärker als im Fall von **2**. Daraus lässt sich schließen, dass in Übereinstimmung mit der Literatur^[13] **1** schneller dephosphoryliert wird als **2**, was die Eignung unserer Methode demonstriert.

Wir verwendeten das Mikroarray für die Untersuchung der Substratspezifität von PTP μ . PTP μ ist eine prototypische rezeptorähnliche Phosphotyrosin-Transmembranphosphatase, die homophil Zell-Zell-Adhäsion vermittelt.^[15a] Sie bindet und dephosphoryliert Catenin-p120^{mm}, und die Peptide DGDFFEEIPEEpYLQ und EGPWLEEEEEEApYGWMDF sind ebenfalls Substrate von PTP μ .^[15b,c] Darüber hinaus ist jedoch wenig über ihre intrazellulären Wechselwirkungen und Signalwege bekannt.^[15b] Die Identifizierung bevorzugter Peptid-Substrate von PTP μ sollte Hilfsmittel zur Aufklärung ihrer biologischen Rolle liefern. Alle 48 pTyr-Peptide wurden durch Spotting auf zwei Bereiche eines Glasträgers aufgetragen und parallel mit PTP μ -D1 (der *in vitro* katalytisch aktiven Domäne D1 von PTP μ) sowie mit Pufferlösung zur Kontrolle inkubiert (Abbildung 3). In beiden Bereichen wurde jedes Peptid zweifach durch Spotting aufgetragen; zusätzlich wurde Cy5-Azid als Standardisierungsfaktor aufgetragen. Zur Analyse wurde jedes Signal mit einem Cy5-Signal im entsprechenden Bereich verglichen. Anschließend wurden die Intensitäten für die PTP-inkubierte Region mit denen der Puffer-inkubierten verglichen, und die relative Si-

gnalverringerung wurde zur weiteren Analyse verwendet.^[12] Diese Analyse wurde mit zwei Glasträgern durchgeführt, sodass jedes pTyr-Peptid viermal getestet wurde. Mittelwerte dieses Dephosphorylierungsexperiments sind in der Tabelle 1 der Hintergrundinformationen aufgelistet.

Um einen Trend in den Eigenschaften der von PTP μ bevorzugten Aminosäuren zu ermitteln, wurde die relative Häufigkeit jeder an einer bestimmten Position eines Peptids befindlichen Aminosäure, das einen Signalrückgang von über 65 % aufwies, mit den Strukturen aller 48 Peptide in Beziehung gesetzt.^[12] Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 graphisch dargestellt.^[16] Generell bevorzugt PTP μ hydrophobe Reste an den Positionen -2, -1 und +1 bezüglich des pTyr-Restes. An Position +1 werden aromatische Reste etwas mehr bevorzugt, und an Position +2 treten polare Reste häufiger auf. Bemerkenswerterweise waren Phosphopeptide, die den pTyr-Rest an dritter Position enthielten, meistens bessere Substrate als solche mit pTyr an zweiter Position. Bei anderen PTPs wurden bereits ähnliche Beobachtungen bezüglich der Rolle von N-terminal flankierenden Aminosäuren bei der Erhöhung der Dephosphorylierungsgeschwindigkeit gemacht.^[3] Diese Beobachtung könnte darauf hinweisen, dass eine positive N-terminale Ladung an Position -1 die Erkennung des Substrats durch PTP μ -D1 stärker reduziert als eine positive Ladung an Position -2. Um sicherzustellen, dass unsere Befunde nicht durch diesen Effekt verfälscht wurden, wurde die Häufigkeit jeder Aminosäure an jeder Position basierend auf den 26 Peptiden, in denen das pTyr an dritter Position ist, erneut berechnet^[12] – der resultierende Trend blieb allerdings gleich.

Um zu demonstrieren, dass die Ergebnisse des Mikroarrays die enzymatische Aktivität in Lösung wiedergeben, wurden alle 48 Peptide mit Phosphomolybdat-Kolorimetrie getestet.^[12,17] Obwohl beide Assays verschiedene Detektionsmethoden nutzen, stimmten die Ergebnisse mit nur wenigen Ausnahmen gut überein. Unter den besten Substraten in Lösung fanden wir 10 Peptide von denjenigen 15 Peptiden, die im Fall von PTP μ einen Signalrückgang von über 65 % auf dem Mikroarray zeigten.^[12] Sehr wahrscheinlich wurde mit dem Mikroarray aufgrund längerer PTP-Inkubationszeit eine größere Zahl bevorzugter Substrate detektiert. Wichtig ist

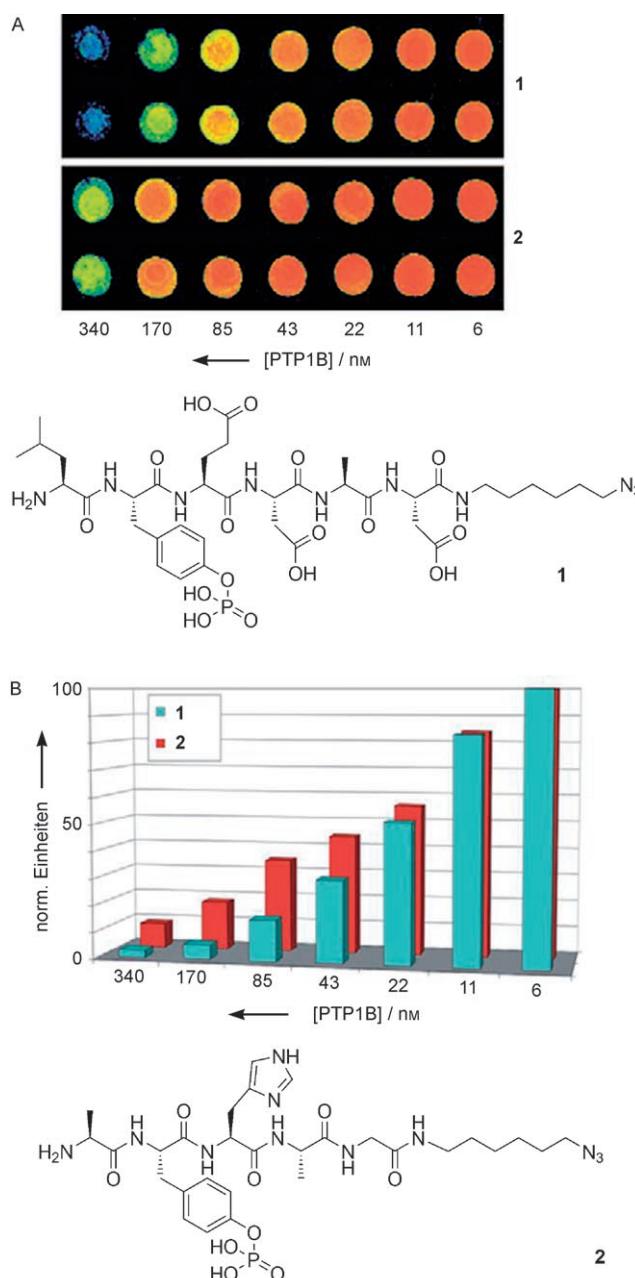


Abbildung 2. Beleg des Konzepts. A) Mikroarray; die Farbveränderung von Rot nach Blau (1) oder Grün (2) zeigt den Signalrückgang bei Erhöhung der PTP-Konzentration an (Doppelbestimmung). B) Histogramm der Signalintensitäten.

jedoch, dass keine falsch-negativen Ergebnisse mit der Mikroarray-Methode gefunden wurden.

Eine analoge Untersuchung wurde mit PTP1B durchgeführt, und wieder wurde eine gute Übereinstimmung zwischen den Daten des Mikroarrays und denen des Lösungssassays festgestellt. Unter den besten Substraten in Lösung fanden wir 10 Peptide von denjenigen 13 Peptiden, die einen Signalrückgang von über 65 % auf dem Mikroarray aufwiesen.^[12] Peptid 2 wurde wiederum als schlechteres Substrat als Peptid 1 detektiert, was die Befunde des oben geschilderten Experiments bestätigt. Zwar fanden wir Unterschiede in der absoluten Rangfolge der Substrate, diese Ergebnisse de-

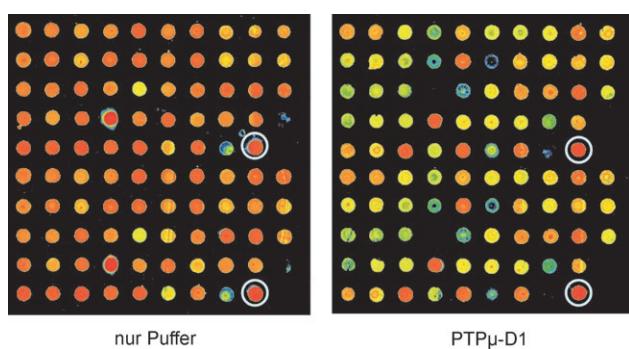


Abbildung 3. Fluoreszenznachweis des an immobilisierte pTyr-Peptide gebundenen, Cy5-markierten Anti-pTyr-Antikörper-Biotin-Streptavidin-Konjugats (1 mM, 250 pL/Spot). Die Glasträger wurden mit PTP μ -D1 (50 μ g mL⁻¹) und auch mit Pufferlösung als Kontrolle inkubiert (1 h, 37°C). Cy5 als Normierungsfaktor ist durch einen Kreis markiert. Alle Verbindungen wurden zweimal pro Array durch Spotting aufgetragen.

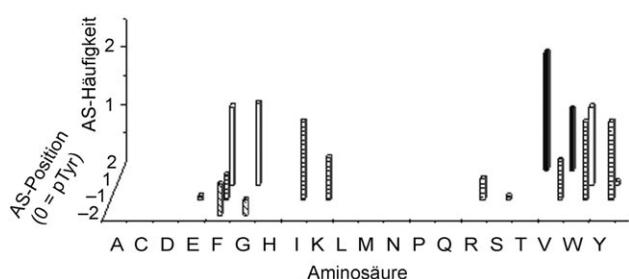
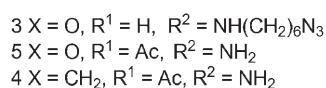
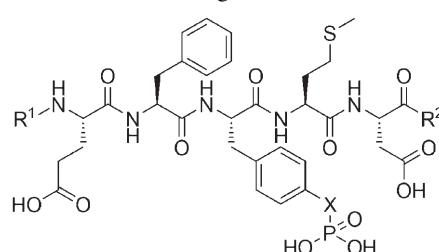


Abbildung 4. Auftragung der bevorzugten Aminosäuren (AS) in allen Positionen (+2 bis -2) der Phosphopeptide auf der Grundlage der Mikroarray-Daten (Säulen: gefüllt +2, offen +1, horizontale Streifen -1, diagonale Streifen -2). Die relative Häufigkeit des Auftretens von Aminosäuren in bestimmten Positionen ist für PTP μ -Substrate gezeigt, die einen Signalrückgang von über 65 % aufweisen.

monstrieren jedoch, dass die pTyr-Peptid-Mikroarrays verlässlich zur qualitativen Bestimmung von PTP-Substratspezifitäten angewendet werden können und dass sie die parallele Untersuchung einer großen Zahl potenzieller Substrate ermöglichen.

An Peptid 3^[19] wurden kinetische Studien mit PTP μ in Lösung mit Phosphomolybdat-Kolorimetrie durchgeführt. 3 wurde mit einem Umsatz von 379 nmol Phosphat pro min und mg Enzym dephosphoryliert, mit einem K_M -Wert von (53 ± 8) μ M und einem k_{cat} -Wert von 1.67 s⁻¹ bei pH 7.5 und 25°C. Die sich ergebende Spezifität konstante ist $k_{spez} = 31.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.^[18] Diese Daten zeigen, dass Substrate, die mit der



Mikroarray-Technik identifiziert wurden, für kinetische Studien mit PTP μ verwendet werden können.

Das Entschlüsseln der Substratspezifitäten von PTPs kann, trotz deren Breite, auch die Entwicklung von Inhibitoren vereinfachen. Dementsprechend wurde Peptid **4**^[19] synthetisiert, das anstelle des pTyr-Restes das nichthydrolysierbare Phosphonomethyl-Phenylalanin (Pmp) trägt, und auf seine Fähigkeit zur Inhibition von PTP μ untersucht. Peptid **5**^[19] wurde in dieser Studie als Substrat verwendet.^[18] Wir fanden einen IC_{50} -Wert von $(50 \pm 3) \mu\text{M}$. Ein Pmp-Analogon des PTP1B-Substrats **1** inhibiert die Aktivität von PTP1B mit einem IC_{50} -Wert von $200 \mu\text{M}$.^[4]

Um zu untersuchen, wie die Peptide **4** und **5** an PTP μ binden, wurden molekulare Dockingstudien durchgeführt.^[12] Die Resultate dieser Studien belegen, dass das Phosphat gut in die Bindungstasche passt, die durch das Schwefelatom des Cystein-Restes des katalytischen Zentrums abgegrenzt ist. Durch detaillierte Analyse der 100 bevorzugten Orientierungen wurden zwei bevorzugte Konformationen identifiziert (Abbildung 5 A,B), die für beide Peptide vergleichbar waren. Diese Konformationen unterscheiden sich in der Orientierung der Phosphatgruppe in der Bindungstasche (Abbildung 5 E und F), wobei die Peptidkette um 180° gedreht ist. In Abbildung 5 C,D ist jeweils eine repräsentative Orientierung in der Bindungstasche von PTP μ abgebildet.

Wir haben eine effiziente Methode für die Herstellung von Phosphopeptid-Mikroarrays mithilfe der Staudinger-Ligation entwickelt und demonstriert, dass diese Mikroarrays zur Untersuchung der In-vitro-Substratspezifitäten von PTPs verwendet werden können. Der Vergleich der Ergebnisse des Mikroarrays mit denen des Lösungssassays zeigt deutlich, dass die mit dem Mikroarray erhaltenen Substratspezifitäten qualitativ verlässlich sind. Die erhaltenen Informationen

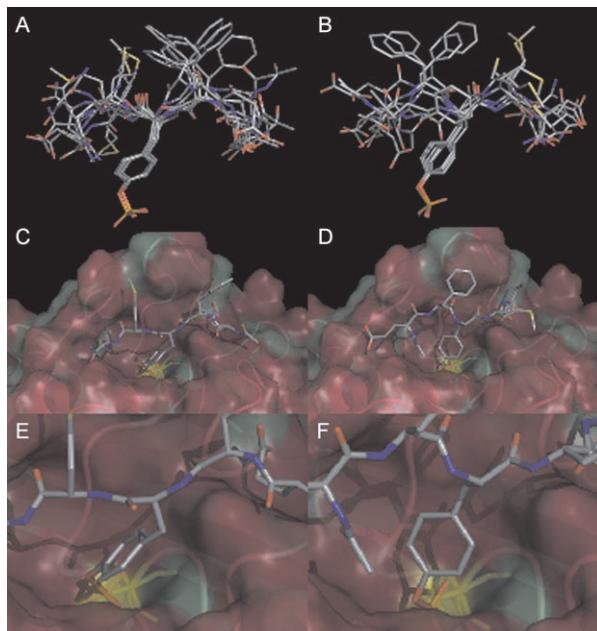


Abbildung 5. Docking des Peptids **5** in die katalytische Tasche von PTP μ . Wasserstoffatome sind nicht gezeigt. Die Oberfläche des Proteins ist entsprechend unpolarer (grün) und polarer (rot) Eigenschaften eingefärbt (siehe Text für Details).

wurden für molekulare Dockingstudien und zum Design eines Inhibitors für PTP μ genutzt.

Eingegangen am 12. April 2007,
veränderte Fassung am 11. Mai 2007
Online veröffentlicht am 28. August 2007

Stichwörter: Enzyme · Inhibitoren · Mikroarrays · Peptide · Substratspezifität

- [1] A. Alonso, J. Sasin, N. Bottini, I. Friedberg, I. Friedberg, A. Osterman, A. Godzik, T. Hunter, J. Dixon, T. Mustelin, *Cell* **2004**, *117*, 699.
- [2] L. Bialy, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 3880; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3814.
- [3] Z.-Y. Zhang, A. M. Thieme-Sefler, D. Maclean, D. J. McNamara, E. M. Dobrusin, T. K. Sawyer, J. E. Dixon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 4446.
- [4] T. R. Burke, H. K. Kole, P. P. Roller, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *204*, 129.
- [5] A.-S. Wavreille, D. Pei, *ACS Chem. Biol.* **2007**, *2*, 109.
- [6] a) S. W. Vetter, Y.-F. Keng, D. S. Lawrence, Z.-Y. Zhang, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 2265; b) M. Garaud, D. Pei, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5366; c) S. Wälchli, X. Espanel, A. Harrenga, M. Rossi, G. Cesareni, R. Hooft van Huijsduijnen, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 311.
- [7] J. Montalibet, K. I. Skorey, B. P. Kennedy, *Methods* **2005**, *35*, 2.
- [8] M. Schutkowski, U. Reinecke, U. Reimer, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 513.
- [9] a) X. Espanel, S. Wälchli, T. Rückle, A. Harrenga, M. Huguenin-Reggiani, R. Hooft van Huijsduijnen, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 15162; b) X. Espanel, M. Huguenin-Reggiani, R. Hooft van Huijsduijnen, *Protein Sci.* **2002**, *11*, 2326; c) X. Espanel, R. Hooft van Huijsduijnen, *Methods* **2005**, *35*, 64; d) C. Pasquali, M.-L. Curchod, S. Wälchli, X. Espanel, M. Guerrier, F. Arigoni, G. Strous, R. Hooft van Huijsduijnen, *Mol. Endocrinol.* **2003**, *17*, 2228.
- [10] a) M. Köhn, R. Wacker, C. Peters, H. Schröder, L. Soulère, R. Breinbauer, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5830; b) A. Watzke, M. Köhn, M. Gutierrez-Rodriguez, R. Wacker, H. Schröder, R. Breinbauer, J. Kuhlmann, K. Alexandrov, C. M. Niemeyer, R. S. Goody, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1436; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1408.
- [11] a) M. B. Soellner, K. A. Dickson, B. L. Nilsson, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11790; b) H. C. Hang, C. Yu, M. R. Pratt, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6.
- [12] Eine detailliertere Beschreibung findet sich in den Hintergrundinformationen.
- [13] Z. Jia, D. Bradford, A. J. Flint, N. K. Tonks, *Science* **1995**, *268*, 1754.
- [14] a) R. Benters, C. M. Niemeyer, D. Wöhrle, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 686; b) R. Benters, C. M. Niemeyer, D. Drutschmann, D. Blohm, D. Wöhrle, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, E10.
- [15] a) S. E. Ensslen, S. M. Brady-Kalnay, *Mol. Cell. Neurosci.* **2004**, *25*, 558; b) G. C. M. Zondag, A. B. Reynolds, W. H. Moolenaar, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 11264; c) A. R. Aricescu, T. A. Fulga, V. Cismasiu, R. S. Goody, S. E. Szedlacek, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *280*, 319.
- [16] Siehe Lit. [12] für eine Abbildung der nicht bevorzugten Aminosäuren.
- [17] K. W. Harder, P. Owen, L. K. Wong, R. Aebersold, I. Clark-Lewis, F. R. Jirik, *Biochem. J.* **1994**, *298*, 395.
- [18] **5** lieferte ähnliche Resultate: $K_M = (8 \pm 1) \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 0.995 \text{ s}^{-1}$ und $k_{\text{spez}} = 124 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.
- [19] Die Verbindungen **1**, **2**, **3**, **4** und **5** entsprechen den Verbindungen **31**, **50**, **6**, **53** bzw. **52** in den Hintergrundinformationen.