

Entwicklung eines Peptids zur selektiven Aktivierung von Proteinphosphatase-1 in lebenden Zellen**

Jayanta Chatterjee, Monique Beullens, Rasa Sukackaite, Junbin Qian, Bart Lesage, Darren J. Hart, Mathieu Bollen* und Maja Köhn*

Ser/Thr-Phosphorylierungen in Proteinen sind von fundamentaler Bedeutung für die biochemische Signalweitergabe in Zellen. Fehlfunktionen dieser Prozesse können zur Entwicklung und dem Fortschreiten von Krankheiten führen. Die Phosphorylierung an Ser- und Thr-Resten in Proteinen wird von Protein-Ser/Thr-Kinasen durchgeführt, und die resultierenden Phosphomonoester werden wiederum von Protein-Ser/Thr-Phosphatasen (PSTPs) hydrolysiert. Während es derzeit noch immer so gut wie keine selektiven Moleküle zur Modulation von Phosphatasen gibt, sind für Ser/Thr-Kinasen zahlreiche Inhibitoren für funktionelle Studien und als Medikamente in Gebrauch.^[1] Die wohl größte Schwierigkeit beim Auffinden selektiver Inhibitoren für PSTPs liegt in deren Gleichartigkeit, insbesondere der katalytischen Tasche, was die Entwicklung von selektiven und hoch affinen Molekülen, die diese Stelle binden, bisher verhindert hat. Aus diesem Grund sind die derzeit eingesetzten Inhibitoren von PSTPs sehr unselektiv und nur von begrenztem Nutzen für funktionelle Studien.^[2] Enzymaktivatoren haben als Alternative zu Inhibitoren seit neuestem an Bedeutung gewon-

nen.^[3] Zwar ist ein möglicher Aktivator von Proteinphosphatase-1 (PP1) bereits beschrieben worden,^[4] jedoch konnte dessen Wirksamkeit und Selektivität in lebenden Zellen bisher nicht demonstriert werden. Daher ist es für die Erforschung dieser Enzyme essentiell, neue potente und selektive Moleküle zu entwickeln, die die Aktivität spezifischer PSTPs modulieren können.^[1,2]

PP1 ist ein weitverbreitetes Enzym, von dem vermutet wird, dass es für den Großteil der Dephosphorylierungen an Ser- und Thr-Resten zuständig ist.^[5,6] PP1 hat eine breite Substratspezifität, wird aber in vivo von vielen PP1-interagierenden Proteinen (PIPs) reguliert (rund 200 in Wirbeltieren), welche Holoenzyme mit der katalytischen Einheit bilden und z.B. als Regulatoren der Aktivität oder Substratspezifisierend wirken.^[6,7] Die Destabilisierung von Holoenzymen durch das Anbinden von Molekülen an spezifischen Kontaktflächen zwischen den PIPs und PP1 ist ein attraktiver Ansatz zum Design von PP1-selektiven Molekülen. Eine dieser Stellen, die in ca. 90 % aller validierten PIPs existiert, ist das PP1-Bindungsmotiv vom RVxF-Typ (Aminosäuren im Einzelbuchstabencode, x = irgendeine Aminosäure). Dieses bindet an eine Stelle in PP1, die entfernt von der konservierten aktiven Tasche liegt.^[8] Es wurde bereits berichtet, dass synthetische Peptide, die Variationen des RVxF-Motivs beinhalten, jedoch nicht die entsprechenden RAXA-Peptide, einen Teil der PIP-PP1-Komplexe in vitro spalten können.^[4,7,9] Generell ist die Destabilisierung von Protein-Protein-Interaktionen durch Peptide aufgrund ihrer hohen Affinität und Spezifität eine wirksame Strategie zur Untersuchung von Signaltransduktionswegen.^[10] Gleichwohl muss hier beachtet werden, dass Peptide häufig wenig zellpenetrierend und nicht stabil sind, was ihre Anwendbarkeit in lebenden Zellen stark limitiert.^[10]

Unser Ziel war es daher, ein proteolytisch stabiles, zellpenetrierendes Peptid zu entwickeln, das spezifisch PP1-PIP-Interaktionen destabilisiert und PP1-abhängige Signaltransduktion in lebenden Zellen beeinflusst. Als Ausgangspunkt wurde **PDP0** (PP1-störendes Peptid, PDP) (Tabelle 1) gewählt, welches das RVxF-Motiv (unterstrichen) und flankierende Sequenzen des Nukleären Inhibitor von PP1 (NIPPI) enthält.^[9] In einem Kompetitionsassay wurde die Befreiung von PP1 von seinem PIP Inhibitor-2 (I2) nach Zugabe von **PDP0** gemessen. I2 bindet an PP1 über das RVxF-Motiv und inhibiert PP1. Die Freilassung führt zur Deinhibierung von PP1, was mithilfe eines Phosphataseaktivitätsassays gemessen wurde. **PDP0** deinhibiert PP1 mit einem EC₅₀ von 87 ± 10 nM (Tabelle 1 und Hintergrundinformationen, Abbildung S1). Durch den folgenden Alanin-Scan von **PDP0** wurde die Bedeutung der basischen N-terminalen Sequenz

[*] Dr. J. Chatterjee, Dr. M. Köhn^[†]
Genome Biology Unit, EMBL
Meyerhofstraße 1, 69117 Heidelberg (Deutschland)
E-Mail: koehn@embl.de

Prof. M. Beullens, J. Qian, Dr. B. Lesage, Prof. M. Bollen^[†]
Laboratory of Biosignaling & Therapeutics
Katholieke Universiteit Leuven
Leuven (Belgien)
E-Mail: Mathieu.Bollen@med.kuleuven.be

Dr. R. Sukackaite, Dr. D. J. Hart
EMBL Grenoble Outstation und Unit of Virus Host-Cell Interactions
UMI3265 UfJ-EMBL-CNRS, Grenoble (Frankreich)

[†] Die Autoren haben zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit beigetragen.

[**] J.C. dankt der Alexander von Humboldt-Stiftung und dem EMBO für Postdoc-Stipendien. R.S. wurde durch das EMBL-EIPOD-Programm unterstützt. M.K. dankt der Deutschen Forschungsgemeinschaft für Unterstützung durch das Emmy-Noether-Programm. M.Be. und M.Be. werden von der Flemish Concerted Research Action (GOA10/16), der National Science Foundation-Flanders (grant G.0478.08), dem Prime Minister's Office (IAP-P6/28P) und dem Cell Imaging Core der KU Leuven unterstützt. A. Hoogmartens, T. Jaspers, N. Sente, G. Van der Hoeven und A. McCarthy gaben technische Hilfe. Kristallstrukturdaten wurden am SOLEIL-Synchrotron gemessen. M.K. dankt C. Meyer für die kritische Durchsicht des deutschen Manuskripts.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201204308> zu finden.

Die Wiederverwertung dieses Beitrags ist gestattet in Übereinstimmung mit den Geschäftsbedingungen, die unter <http://angewandte.de/open> aufgeführt sind.

Tabelle 1: Effizienz der Peptide in der Destabilisierung des PP1:I2-Komplexes.^[a]

Peptid	Sequenz	EC ₅₀ [nM]
PDP0	RPKRKRKNSRVTFSEDEII	87 ± 10
PDP1	RPKRKRKNARVTFEAAEII	21 ± 2
PDP2	RRKRPKRRKKNARVTFEAAEII	53 ± 8
PDP2m	RRKRPKRRKKNARATAEAAEII	nicht aktiv
PDP3	RRKRPKRRKKNARVTFBpaEAAEII	176 ± 13
PDP3m	RRKRPKRRKKNARATABpaEAAEII	nicht aktiv

[a] Siehe auch Abbildung S1. Die Resultate sind als Mittelwert ± S.E.M. ($n = 4$) dargestellt. Die Werte wurden mit einem In-vitro-Phosphatase-assay ermittelt, bei dem die Aktivität von PP1 gegen das ³²P-markierte Substrat Glycogenphosphorylase α gemessen wurde.^[9]

und der zwei C-terminalen Isoleucine für die potente De-inhibition von PP1 deutlich (Abbildung 1 und Abbildung S2). C- und N-terminale Verkürzungen von **PDP0** bestätigten diese Ergebnisse. Daraufhin wurden die zwei RVxF-flankierenden Serine und die Aminosäuren der C-terminalen sauren EDDE-Sequenz gleichzeitig mit Alanin ersetzt, was die Effizienz der De-inhibition weiter verstärkte (Abbildung S3). Diese Daten führten zur Entwicklung des optimierten Peptids **PDP1** (Tabelle 1 und Abbildungen S1 und S3).

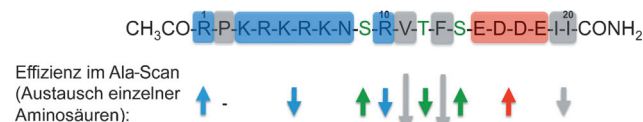


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Ergebnisse des Ala-Scans. Gezeigt sind relative Änderungen in der Effizienz der Peptide zur Destabilisierung des PP1:I2-Komplexes (siehe auch Abbildung S2). Der aufwärts gerichtete Pfeil zeigt einen Anstieg, der abwärts gerichtete eine Abnahme der Effizienz an. Farblegende: blau basisch, grün hydrophil, grau hydrophob, rot saure Reste.

Das RVxF-Motiv von PIPs bindet an PP1 in einer ausgestreckten Konformation.^[8] Um das Peptid in dieser Konformation auszurichten, synthetisierten wir lineare Peptide mit D-Pro-L-Pro- (Abbildung S4) und D-Pro-L-Dap-Sequenz (L-Dap = L-2,3-Diaminopropionsäure) und auch Disulfid-verbrückte cyclische Peptide (Schema S1 und Abbildung S5).^[11] Diese Vorausrichtung resultierte allerdings in einer Abschwächung der Effizienz der Peptide. Diese Beobachtung passt zu der Tatsache, dass die das RVxF-Motiv flankierenden Sequenzen in PIPs im ungebundenen Zustand strukturell flexibel sind.^[6] Zusammengefasst ergaben die Alanin-, Verkürzungs-, Mehrfach-Alanin- und auch D-Pro-L-Pro/Dap-Scans, dass die basische Aminosäuresequenz (–KRKRK–) N-terminal zum RVTF-Motiv und zwei hydrophobe Reste (–II–) C-terminal zum RVTF-Motiv in **PDP0** essenziell für die Bindung an PP1 sind. Die C-terminale saure Sequenz (–EDDE–) und die zwei RVTF-flankierenden Serine destabilisieren die Bindung von **PDP0** an PP1.

Im nächsten Schritt testeten wir die Zellgängigkeit der Peptide mittels konfokaler Mikroskopie. Lebende Zellen

wurden mit 5-Carboxyfluorescein(FAM)-markierten Peptiden inkubiert. Wir verwendeten konfokale Mikroskopie, da man dadurch deutlich zwischen intrazellulären Peptiden und Peptiden, die an der extrazellulären Zelloberfläche anhaften, unterscheiden kann. FAM-**PDP1** war nicht zellgängig (Abbildung 2a), und wir beobachteten extra- und intrazelluläre

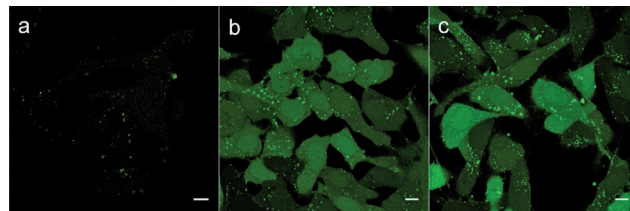


Abbildung 2. Zelldurchgängigkeit der Peptide in lebenden U2OS-Zellen (humane Osteosarcoma-Zellen), die 2 h mit 25 μ M Fluorescein-markiertem **PDP1** (a), **PDP2** (b) und **PDP2m** (c) inkubiert wurden. Maßstab 10 μ m.

Aggregation in verschiedenen Zelllinien bei höheren Peptidkonzentrationen (Abbildung S6). Daraufhin verwendeten wir eine schrittweise Designstrategie, die die sequentielle Addition von Arginin- und Lysin-Resten zum N-Terminus beinhaltet, mit dem Ziel, die Zellgängigkeit zu erhöhen ohne die Effizienz des Peptids signifikant zu verringern. Dies führte zu Peptid **PDP2**, das den PP1:I2-Komplex mit etwas geringerer Effizienz als **PDP1** destabilisierte (Tabelle 1). Die entsprechende RATA-Mutante **PDP2m** war im Kompetitionsassay wie erwartet inaktiv (Tabelle 1), was die große Bedeutung von Valin und Phenylalanin für die hochaffine Bindung von **PDP2** an PP1 bestätigt.

FAM-**PDP2** wurde effizient in verschiedenen Konzentrationen in diverse Zelllinien aufgenommen. Die Verteilung war diffus im Zyto- und Nucleoplasma, und zu einem geringen Teil wurden entweder vesikuläre Lokalisation oder Aggregation des Peptids beobachtet (Abbildung 2b und Abbildung S6). Der Unterschied zwischen **PDP1** und **PDP2** im Zellpenetrationsverhalten kann jedoch nicht auf die FAM-Markierung zurückgeführt werden, da diese in beiden Peptiden vorhanden ist. Die zelluläre Aufnahme von FAM-**PDP2** war bei 4 °C geringer als bei 37 °C (Abbildung S7), was auf das Vorhandensein sowohl eines energieabhängigen als auch eines energieunabhängigen Aufnahmemechanismus hindeutet.^[12] FAM-**PDP2m** wurde in vergleichbarer Menge wie FAM-**PDP2** aufgenommen (Abbildung 2b,c).

Nachdem die Zellpenetration der Peptide etabliert war, wurde die Selektivität von **PDP2** gegenüber PP1 und der verwandten Phosphatase PP2A untersucht. Dafür wurden **PDP2** und **PDP2m** aus HEK293- (humane embryonische Nierenzellen) (Abbildung 3a) und U2OS-Zelllysaten (Abbildung S8) mittels Streptavidin-ummanteltem Sepharose-Harz präzipitiert, was zu einer konzentrationsabhängigen Cosedimentation von PP1 führte. Die strukturell verwandte PP2A wurde hingegen nicht durch **PDP2** präzipitiert (Abbildung 3b). Es wurde keine Spezifität von **PDP2** gegenüber den drei PP1-Isoformen (α , β , und γ) beobachtet (Abbildung S9), und **PDP2m** copräzipitierte weder PP1 noch PP2A

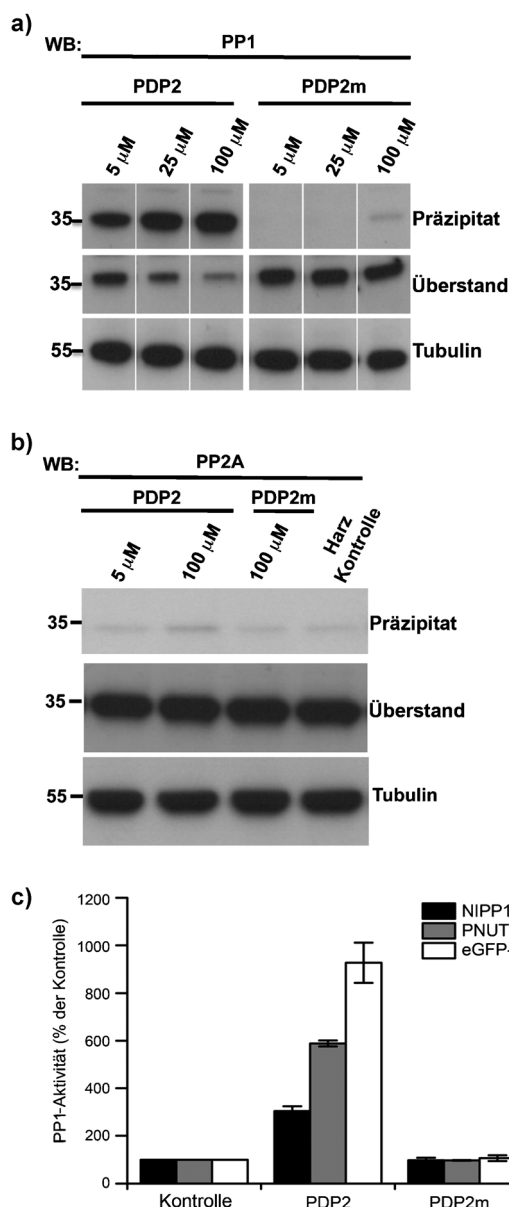


Abbildung 3. Selektivität und Effizienz von **PDP2** in der Destabilisierung von PIP:PP1-Komplexen. a) Western-Blot von PP1 aus einem Streptavidin-vermittelten Pulldown von biotinyliertem **PDP2** und **PDP2m** aus HEK293-Zelllysaten. Der komplette Blot ist in Abbildung S8 gezeigt. b) Immunblot von PP2A aus einem Streptavidin-vermittelten Pulldown von biotinyliertem **PDP2** und **PDP2m** aus U2OS-Zelllysaten. Das Kontroll-Harz ist nicht mit Streptavidin ummantelt. Die Tubulinkontrollen in (a) und (b) stammen aus dem Überstand. c) Destabilisierung von PP1-Holoenzymen durch 20 μ M der Peptide in vitro. Kontrolle: TBS-Puffer. Die Resultate sind als Mittelwert \pm Standardabweichung ($n=3$) dargestellt.

(Abbildung 3a,b). Weiterhin wurde die Effizienz von **PDP2**, PP1-Holoenzymkomplexe in vitro zu destabilisieren, mithilfe von PP1:PIP-Komplexen, die frisch durch PIP-gerichtete Antikörper immunpräzipitiert wurden, analysiert. Diese Komplexe wurden mit **PDP2** und **PDP2m** inkubiert und anschließend auf PP1-Aktivität mittels 32 P-markierter Phosphorylase α wie oben beschrieben überprüft. Die resultierende PP1-Aktivität korreliert mit der Menge des vom

Komplex losgelösten aktiven PP1-Enzyms. **PDP2** destabilisierte alle getesteten PP1-Holoenzyme in vitro, während **PDP2m** inaktiv war. Dieses Ergebnis untermauert das Potenzial von **PDP2** als zellpenetrierendes, PP1-Holoenzymdestabilisierendes Peptid.

Um im Detail zu verstehen wie **PDP2** mit PP1 interagiert, lösten wir die Kristallstruktur des PP1:**PDP2**-Komplexes mit einer Auflösung von 3.1 Å (Abbildung 4). Die Struktur zeigt,

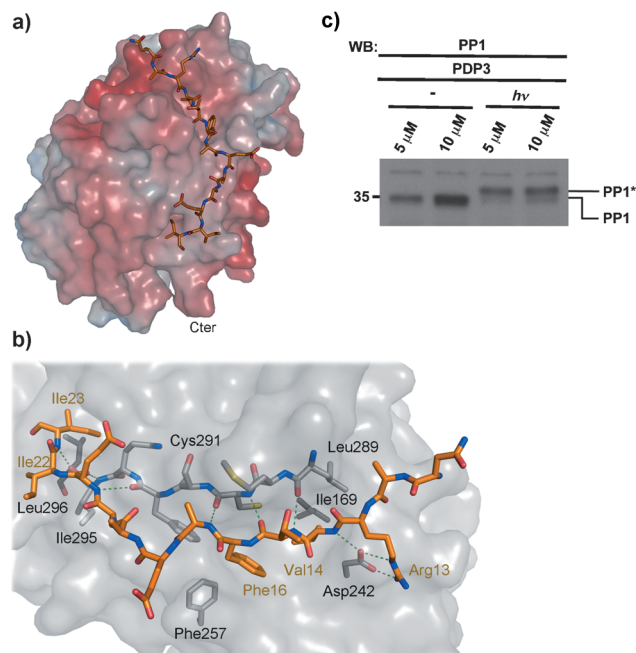


Abbildung 4. Beweis der direkten Interaktion von **PDP2** und **PDP3** mit PP1. a) Kristallstruktur des auf der sauren Oberfläche von PP1 gebundenen **PDP2**. Die Oberfläche ist entsprechend der elektrostatischen Potentiale (berechnet mittels ABPS)^[15] gefärbt. Potentialskala: von -10 kTe^{-1} (rot) bis 10 kTe^{-1} (blau).^[15] Die Koordinaten sind in der Protein-Datenbank (PDB) unter dem Zugangscode 4G9J zu finden. b) Detaillierte Übersicht der Interaktionen von **PDP2** (gelb) und PP1 (grau). Wasserstoffbrücken sind grün dargestellt. Ein Stereobild der Elektronendichte um das Peptid herum ist in Abbildung S10 gezeigt. c) Immunblot von PP1 aus einem Streptavidin-Pulldown von biotinyliertem **PDP3** aus U2OS-Zelllysaten mit und ohne UV-Bestrahlung (365 nm) (Hintergrundinformationen). PP1* markiert den kovalent gebundenen PP1:**PDP3**-Komplex. Die höhere Bande ist unspezifisch.

dass **PDP2** in dieselbe Bindungstasche von PP1 bindet wie auch andere strukturell charakterisierte PIPs, die das RVxF-Motiv beinhalten (Abbildung 4a).^[8,13] Ausgehend vom C-Terminus sind 13 Aminosäuren von **PDP2** in gestreckter Konformation sichtbar (1-RRKRPRKRKNARVTFAEAAEII-23), wobei Arg13, Val14, Thr15, Ala17, Glu21 und Ile23 Wasserstoffbrücken zu Atomen im Rückgrat von PP1 ausbilden. Val14 und Phe16 sind tief in der RVxF-Bindungstasche gebunden, und Arg13 interagiert mit Asp242 von PP1 (Abbildung 4b), was früheren Strukturen ähnelt.^[8,14] Das C-terminale Isoleucin bildet Van-der-Waals-Kontakte mit Leu296 von PP1, was eine mögliche Erklärung für die niedrigere Potenz des von Ile zu Ala mutierten Peptids sein könnte. Hydrophobe Interaktionen von Leu296 wurden auch

im PP1:Spinophilin-Komplex beobachtet.^[14] Mutation der basischen N-terminalen Reste in **PDP2** führten zu einer geringeren Potenz. Diese Reste sind in der Kristallstruktur nicht erkennbar, allerdings deutet die Position des sichtbaren N-Terminus von **PDP2** darauf hin, dass diese basischen Reste sich in der Nähe einer negativ geladenen Region auf der Oberfläche von PP1 befinden (Abbildung 4a). Daher könnten elektrostatische Interaktionen zwischen dieser sauren Region auf PP1 und dem basischen N-Terminus von **PDP2** den Komplex stabilisieren.

Um die direkte Interaktion von **PDP2** mit PP1 in Zelllysaten nachzuweisen, entwickelten wir photovernetzable Analoga. Dazu wurden Phe17 und Ala18 von **PDP2** mit L-4-Benzoylphenylalanin (*Bpa*) ersetzt.^[16] Die Analoga wurden biotinyliert, um den photovernetzten Komplex aus Zelllysaten präzipitieren zu können. Während der Austausch von Phe17 gegen *Bpa* keinen kovalenten Komplex lieferte (Abbildung S11), ergab das Peptid, in dem Ala18 mit *Bpa* ausgetauscht worden war (**PDP3**) (Tabelle 1), nach Bestrahlung mit ultraviolettem Licht (365 nm) einen kovalenten Komplex mit PP1. Dessen Bildung war konzentrationsabhängig (Abbildung 4c), was die direkte physikalische Interaktion von PP1 mit **PDP3** bewies. Die PP1:**PDP2**-Kristallstruktur liefert eine mögliche Erklärung für die effiziente Vernetzung von **PDP3** mit PP1. Das Met290 von PP1 befindet sich in unmittelbarer Nähe zu Ala18, sodass das eingesetzte *Bpa* eine kovalente Bindung mit der Seitenkette des Met290 eingehen kann. Wir untersuchten daraufhin, ob **PDP3** auch in intakten Zellen angewendet werden kann. Verschiedene Zelllinien nahmen FAM-**PDP3** und FAM-**PDP3m** effizient auf (Abbildung S12), und die Zellpenetration und Lokalisation von FAM-**PDP3** war sehr ähnlich der von FAM-**PDP2** (Abbildung S13). Wie **PDP2** konnte auch biotinyliertes **PDP3** PP2A nicht copräzipitieren (Abbildung S14).

Im nächsten Schritt untersuchten wir den Effekt der **PDPs** auf die PP1-Aktivität in intakten Zellen. Zunächst testeten wir, ob die Behandlung von Zellen mit **PDPs** einen Effekt auf die mitotische Phosphorylierung von Histon H3 an Threonin 3 (T3) haben würde (Abbildung 5a), da Histon H3T3 ein etabliertes Substrat von PP1 ist.^[17] **PDP2** zeigte überraschenderweise keinen Effekt, selbst wenn es in fünf-fachem Überschuss verglichen mit **PDP3** eingesetzt wurde (Abbildung S15). Trotz der niedrigeren Potenz von **PDP3** verglichen mit **PDP2** in vitro führte die Behandlung mit **PDP3** zur Dephosphorylierung von H3T3, wobei eine klare Konzentrationsabhängigkeit beobachtet werden konnte (Abbildung 5b). Weiterhin testeten wir, ob die Biotinylierung der Peptide eine Auswirkung haben würde. Allerdings wurden keine Unterschiede im Verhalten der acetylierten und biotinylierten Peptide festgestellt (Abbildung 5a). Da die Zellpenetrationseigenschaften von **PDP2** und **PDP3** sehr ähnlich waren, kann die höhere Effizienz von **PDP3** nicht auf diese Eigenschaften zurückgeführt werden. Des Weiteren könnte die höhere Potenz von **PDP3** in einer höheren zellulären Stabilität dieses Peptids und auch einer potenziellen Photovernetzung durch das *Bpa* begründet sein. Letzteres kann jedoch ausgeschlossen werden, da in den mit **PDP3** behandelten Zelllysaten ohne UV-Bestrahlung keine Photovernetzung stattfand (Abbildung 4c).

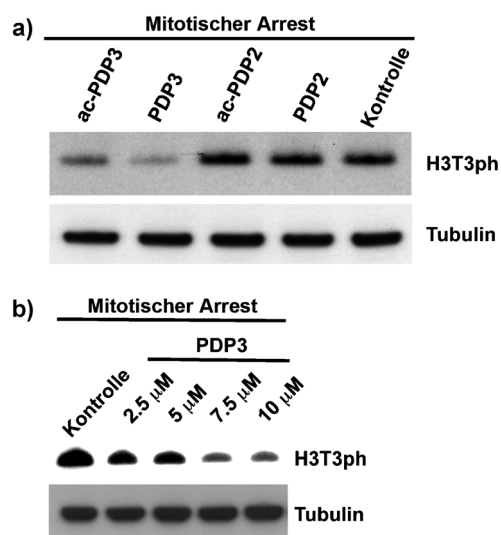


Abbildung 5. Effekt der Peptide auf den PP1-abhängigen Phosphorylierungsstatus von Histon H3T3 in lebenden Zellen. a) Immunblot der Zelllysate, nachdem intakte U2OS-Zellen mit 10 µM acetylierten (ac-) und biotinylierten (kein Präfix) Peptiden sowie einer Puffer-Kontrolle für 3 h während mitotischem Arrest inkubiert wurden (Hintergrundinformationen). b) Immunblot des konzentrationsabhängigen Effekts von **PDP3** unter den gleichen Bedingungen wie in (a) beschrieben.

Um die Hypothese der erhöhten Stabilität zu testen, wurden die Stabilitäten von FAM-**PDP2** und FAM-**PDP3** in lebenden Zellen verglichen. Intakte U2OS-Zellen (im mitotischen Arrest, um die gleichen Bedingungen wie zuvor zu erhalten) wurden mit verschiedenen Konzentrationen an FAM-**PDP2** und FAM-**PDP3** für 3 h inkubiert und nachfolgend lysiert. Die verbliebenen Mengen an Peptiden wurden dann durch Gel-Fluoreszenzanalyse ermittelt (Hintergrundinformationen). Die Ergebnisse belegen deutlich, dass unter diesen Bedingungen FAM-**PDP3** signifikant stabiler ist als FAM-**PDP2** (Abbildung 6). Dies stützt unsere Hypothese, dass der Austausch der natürlichen Aminosäure Ala durch die nichtnatürliche *Bpa* die zelluläre Stabilität des Peptids erhöht. Da **PDP3** in Zellen stabiler ist als **PDP2**, welches wiederum in vitro potenter ist, und beide Peptide ähnliche Zellpenetrationseigenschaften aufweisen, ist bewiesen, dass **PDP3** den Effekt nach dem Eintritt in die Zelle erzielt, und nicht durch unspezifische Adhäsion an der Zelloberfläche. Weiterhin zeigen unsere Ergebnisse wie schwierig es ist, peptidische Proben aus der In-vitro-Situation in die Umgebung in lebenden Zellen zu übertragen, da unerwartete Effekte auftreten können.

Aufgrund dieser Beobachtung verwendeten wir **PDP3** für die folgenden Experimente. Dabei wurde das biotinylierte Peptid gewählt, da wir keinen Einfluss des Biotins auf den Effekt des Peptids gesehen hatten (Abbildung 5a) und wir so das Peptid in den Zellen mittels Immunfluoreszenz verfolgen konnten, um Zellpenetration und Lokalisation zu kontrollieren (Abbildung S16). Als Nächstes untersuchten wir, ob **PDP3** PP1-Holoenzyme in lebenden Zellen destabilisieren kann. Nach 3 h Inkubation von U2OS mit 10 µM **PDP3**, Zelllyse und Analyse (Hintergrundinformationen) konnte für drei der fünf untersuchten PIPs eine reduzierte Anbindung

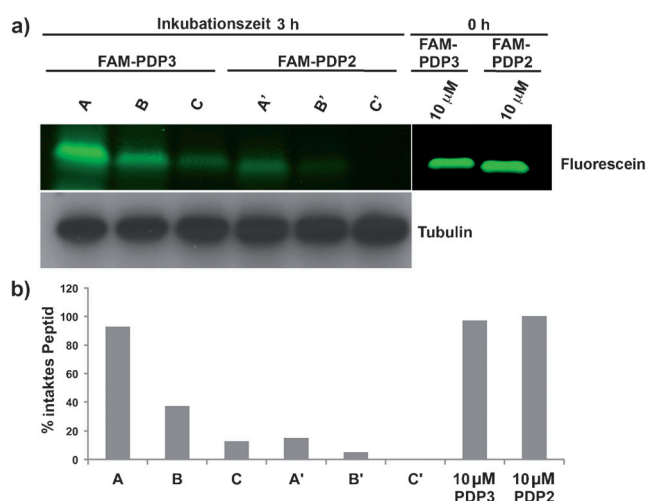


Abbildung 6. Stabilität von FAM-PDP2 und FAM-PDP3 in Zellen. a) Gel-Fluoreszenzanalyse von Zelllysaten nach der Inkubation von U2OS-Zellen mit Peptiden für 3 h während mitotischem Arrest, anschließend Waschen und Zellyse (Hintergrundinformationen). Peptidkonzentrationen bei Beginn: A) 10 μ M, B) 5 μ M und C) 1 μ M FAM-PDP3; A') 10 μ M, B') 5 μ M und C') 1 μ M FAM-PDP2. b) Quantifizierung der fluoreszierenden Banden durch Normalisierung mit der Tubulin-kontrolle. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von zweien.

von PP1 beobachtet werden (Abbildung 7a). Diese Ergebnisse bestätigen die Aktivität von **PDP3**, PP1-Holoenzyme in lebenden Zellen zu destabilisieren.

Weiterhin prüften wir den Effekt von **PDP3** auf weitere Phosphorylierungsstellen in Histon H3 während der Mitose, welche ebenfalls Substrate von PP1 sind.^[17] **PDP3** reduzierte die Phosphorylierung von Histon H3 an Thr3 und Ser28, hatte aber keinen signifikanten Effekt auf Ser10 und Thr11 (Abbildung 7b). Dies ist im Einklang mit publizierten Daten, die zeigen, dass H3T3 und H3S28 in vitro durch PP1 in einer geringeren Konzentration als H3S10 und H3T11 dephosphoryliert werden.^[17] **PDP3m** hatte keinen Effekt auf die Dephosphorylierung des Histons (Abbildung 7b), was darauf hinweist, dass **PDP3** die Dephosphorylierung spezieller Reste in Histon H3 in intakten Zellen beschleunigt, indem es an PP1 bindet.

Obwohl sie eine zellpenetrierende Sequenz beinhalten, zeigten weder **PDP3** noch **PDP3m** Zytotoxizität unter den angewendeten experimentellen Bedingungen. Zur weiteren Überprüfung inkubierten wir Zellen bis zu 48 h mit **PDP3** und **PDP3m**. Nur für **PDP3** wurde hier Zytotoxizität beobachtet, was darauf hindeutet dass die Toxizität auf eine höhere Aktivität von PP1 in Zellen zurückgeführt werden kann, aber nicht auf eine unspezifische Zytotoxizität der polypeptischen Sequenz (Abbildung S17).

H3T3ph wird während der Mitose von einem Komplex aus PP1 und der PP1-gerichteten Untereinheit Repo-Man des Histons H3 dephosphoryliert.^[17] Die Beobachtung, dass **PDP3** den PP1:(Repo-Man)-Komplex destabilisiert (Abbildung 7a), weist darauf hin, dass Histon H3 von **PDP3**-gebundener PP1 dephosphoryliert wird, die nicht durch ein PIP auf ein Substrat gerichtet ist. Diese Hypothese wurde durch die Überprüfung des Effekts von **PDP3** auf mitotisches

H3T3ph nach siRNA-vermitteltem Repo-Man-Knockdown bestätigt (Abbildung 7c). In Zellen mit Repo-Man-Defizienz wurde die Hyperphosphorylierung von H3T3 beobachtet. Dieser Phänotyp wurde durch Vorbehandlung mit **PDP3** aufgehoben, wobei die Menge an PP1 gleichblieb. Die Behandlung mit **PDP3** resultierte auch in der Dephosphorylierung von PP1 an Thr320 (Abbildung 7c). Es wurde beschrieben, dass diese Stelle von PP1 selbst dephosphoryliert wird, was zu einer partiellen Aktivierung von PP1 führt, die abhängig vom Zellzyklus ist.^[18] Daher könnte, zusätzlich zu der Destabilisierung von Holoenzymen, die Dephosphorylierung von Thr320 ein weiterer möglicher Mechanismus sein, durch den **PDP3** PP1 aktiviert.

Im nächsten Schritt wurden Effekte der erhöhten Dephosphorylierung von Histon H3T3 während der Mitose untersucht, die durch Behandlung mit **PDP3** ausgelöst wurden. H3T3ph ist eine Andockstelle für Survivin, eine regulierende Untereinheit der Aurora-B-Kinase, die die Ausrichtung dieser essenziellen mitotischen Kinase zu den Centromeren während der Prometaphase vermittelt.^[19] Entsprechend dieser mitotischen Funktion der Phosphorylierung von H3T3 beobachteten wir mittels Immunfluoreszenz, dass **PDP3**, aber nicht **PDP3m**, die centromerische Lokalisation von H3T3ph und Aurora B in mitotisch arretierten U2OS-Zellen verhinderte (Abbildung 7d-f). Ähnliche Effekte wurden auch für den Knockdown der H3T3-Kinase Haspin^[19] und die Überexpression von Repo-Man^[17] beschrieben. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass **PDP3** PP1 in lebenden Zellen aktiviert.

Zusammengefasst beschreiben wir hier die Entwicklung eines zellpenetrierenden Peptids (**PDP3**), das mit endogenen, das RVxF-Motiv enthaltenden PIPs um die Anbindung an PP1 in lebenden Zellen konkurriert. Das Peptid bindet nicht an die nahe verwandte Phosphatase PP2A. Wir zeigten, dass man durch die einfache Modifikation eines Peptids mit einer nichtnatürlichen Aminosäure eine erstaunliche Stabilität der Peptide in intrazellulärer Umgebung erreichen kann. Weiterhin belegt unsere Studie, dass sorgfältig entwickelte zellpenetrierende Peptide keine unspezifische Toxizität aufweisen müssen. Die Ergebnisse demonstrieren, dass eine Balance zwischen zellpenetrierenden Eigenschaften, der Aktivität in vitro (**PDP3** hat einen höheren EC₅₀-Wert als dessen Vorläuferpeptide) und der Stabilität in Zellen entscheidend für peptidische Proben ist. Wir konnten demonstrieren, dass **PDP3** durch das Blockieren von PP1-PIP-Interaktionen und das Fördern der Auto-Dephosphorylierung aktive PP1 generiert, welche effizient einen Teil der PP1-Substrate dephosphoryliert. Übereinstimmend mit biochemischen und strukturellen Studien machen unsere Daten deutlich, dass es eine Hauptaufgabe der PIPs ist, PP1 an der unkontrollierten Dephosphorylierung von Substraten zu hindern.^[7,20] Weiterhin belegt unsere Studie, dass es möglich ist, PP1 selektiv in lebenden Zellen zu aktivieren, was neue Wege zur Untersuchung von PP1-Signalwegen und -Mechanismen eröffnet.^[3] Die Tatsache, dass die Behandlung mit **PDP3** zum gleichen Ergebnis bezüglich H3T3-Phosphorylierung führt wie die Zugabe eines Inhibitors der H3T3-Kinase Haspin,^[21] legt die Hypothese nahe, dass **PDP3** (oder Derivate davon) oder äquivalente niedermolekulare Verbindungen therapeutisches

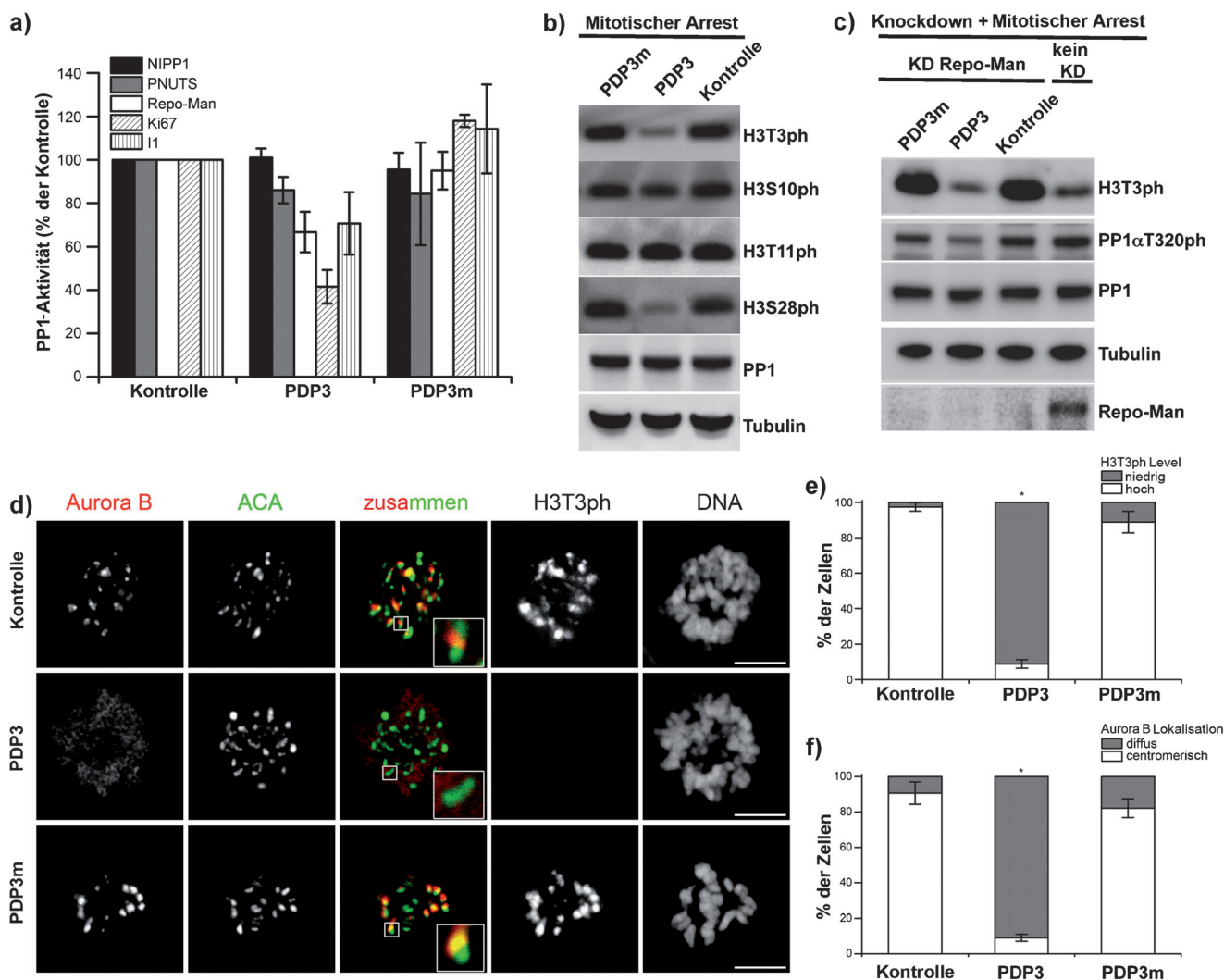


Abbildung 7. Die Effizienz und resultierende Effekte von **PDP3** in lebenden Zellen. a) Destabilisierung von PP1-Holoenzymen nach 3 h Inkubation von U2OS-Zellen mit einer 10 μ M Lösung der Peptide während mitotischem Arrest und anschließender Zellyse. Kontrolle: TBS-Puffer. Die Resultate sind als Mittelwert \pm Standardabweichung ($n=3$) dargestellt. b) Immunblots von U2OS-Zellen, die wie in (a) behandelt wurden. c) Immunblot von Zellen wie in (b) nach Repo-Man-Knockdown. d) Konfokale Bilder von U2OS-Zellen im mitotischen Arrest nach 1 h Inkubation mit einer Kontrolle (Dimethylsulfoxid), 40 μ M **PDP3** und 40 μ M **PDP3m** vor der Fixierung. Höhere Konzentrationen von **PDP3** und eine kürzere Inkubationszeit als in vorherigen Experimenten wurden verwendet, um einen akuten Effekt zu erzielen, der klar unter den experimentellen Bedingungen der Immunfluoreszenz ersichtlich ist. ACA ist ein Kinetochor-Marker. Skalierung: 5 μ m. e) Quantifizierung der Änderungen des H3T3-Phosphorylierungslevels und f) Quantifizierung der Lokalisierung von Aurora B nach der Behandlung mit den Peptiden. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung ($n=3$) dargestellt; * $P < 0.01$, t-Test.

Potenzial als Antagonisten von pathologisch erhöhter Kinase-Aktivität haben könnten. Weiterhin könnten diese Moleküle genutzt werden, um Zellen für klinisch verwendete Kinase-inhibitoren zu sensibilisieren. Außerdem kann die Kristallstruktur des PP1:PDP2-Komplexes als Templat für das Design weiterer hochwirksamer Peptide oder Peptidomimetika zur Destabilisierung von PP1-Holoenzymen verwendet werden.

Eingegangen am 3. Juni 2012

Online veröffentlicht am 7. September 2012

Stichwörter: Enzymaktivierung · Proteinphosphatase-1 · Protein-Protein-Interaktionen · Wirkstoffentwicklung · Zellpenetrierende Peptide

- [1] J. L. McConnell, B. E. Wadzinski, *Mol. Pharmacol.* **2009**, *75*, 1249–1261.
- [2] A. McCluskey, A. T. R. Sim, J. A. Sakoff, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1151–1175.
- [3] J. A. Zorn, J. A. Wells, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 179–188.
- [4] E. Tappan, A. R. Chamberlin, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 167–174.
- [5] H. Ceulemans, M. Bollen, *Physiol. Rev.* **2004**, *84*, 1–39.
- [6] M. Bollen, W. Peti, M. J. Ragusa, M. Beullens, *Trends Biochem. Sci.* **2010**, *35*, 450–458.
- [7] A. Hendrickx, M. Beullens, H. Ceulemans, T. Den Abt, A. Van Eynde, E. Nicolaescu, B. Lesage, M. Bollen, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 365–371.
- [8] M. P. Egloff, D. F. Johnson, G. Moorhead, P. T. Cohen, P. Cohen, D. Barford, *EMBO J.* **1997**, *16*, 1876–1887.
- [9] M. Beullens, A. Van Eynde, V. Vulsteke, J. Connor, S. Shenolikar, W. Stalmans, M. Bollen, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 14053–14061.

- [10] L. D. Walensky, A. L. Kung, I. Escher, T. J. Malia, S. Barbuto, R. D. Wright, G. Wagner, G. L. Verdine, S. J. Korsmeyer, *Science* **2004**, *305*, 1466–1470.
- [11] J. A. Robinson, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1278–1288; b) J. Chatterjee, C. Gilon, A. Hoffman, H. Kessler, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1331–1342.
- [12] G. Ter-Avetisyan, G. Tünnemann, D. Nowak, M. Nitschke, A. Herrmann, M. Drab, M. C. Cardoso, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 3370–3378.
- [13] P. Wakula, M. Beullens, H. Ceulemans, W. Stalmans, M. Bollen, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 18817–18823.
- [14] M. J. Ragusa, B. Dancheck, D. A. Critton, A. C. Nairn, R. Page, W. Peti, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 459–464.
- [15] N. A. Baker, D. Sept, S. Joseph, M. J. Holst, J. A. McCammon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 10037–10041.
- [16] M. L. Stewart, E. Fire, A. E. Keating, L. D. Walensky, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 595–601.
- [17] J. Qian, B. Lesage, M. Beullens, A. Van Eynde, M. Bollen, *Curr. Biol.* **2011**, *21*, 766–773.
- [18] J. Q. Wu, J. Y. Guo, W. Tang, C. S. Yang, C. D. Freel, C. Chen, A. C. Nairn, S. Kornbluth, *Nat. Cell Biol.* **2009**, *11*, 644–651.
- [19] A. E. Kelly, C. Ghenoïu, J. Z. Xue, C. Zierhut, H. Kimura, H. Funabiki, *Science* **2010**, *330*, 235–239.
- [20] M. J. Ragusa, M. Allaire, A. C. Nairn, R. Page, W. Peti, *FEBS Lett.* **2011**, *585*, 36–40.
- [21] D. Huertas et al., *Oncogene* **2012**, *31*, 1408–1418. Siehe Hintergrundinformationen.