

**REGULATION DER ENZYMAKTIVITÄT DER PROTEINTYROSINPHOSPHATASE
SHP-1 DURCH MONOPHOSPHORYLIERTE SH2-DOMÄNEN-LIGANDEN**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller Universität Jena

von Diplom-Ernährungswissenschaftlerin Kornelia Hampel,
geboren am 08.11.1979 in Leipzig

1. Gutachter Prof. Dr. Torsten Heinzel
2. Gutachter Prof. Dr. Frank-D. Böhmer
3. Gutachter Prof. Dr. Frank Bordusa

Tag der mündlichen Prüfung 17.11.2006
Tag der öffentlichen Verteidigung 18.12.2006

1. EINLEITUNG.....	1
2. PROTEINKINASEN UND PROTEINPHOSPHATASEN	2
2.1. Proteintyrosinphosphatasen (PTP)	2
2.1.1. Klassifizierung von PTPs	2
2.1.2. Katalysemechanismus der PTPs.....	3
2.2. Tyrosinphosphatasen mit SH2-Domänen.....	4
2.2.1. SHP-1	5
2.2.1.1. Expression von SHP-1	5
2.2.1.2. Struktur von SHP-1	5
2.2.1.3. Substratspezifität von SHP-1	7
2.2.1.4. Regulation der katalytischen Aktivität	7
2.2.1.5. Biologische Funktion von SHP-1	11
2.3. Regulatorische Phosphotyrosin-bindende Proteindomänen.....	17
2.3.1. PTB-Domänen.....	17
2.3.2. C2-Domänen.....	18
2.3.3. SH2-Domänen	18
2.3.3.1. Struktur von SH2-Domänen	19
2.3.3.2. Klassifizierung von SH2-Domänen.....	20
2.3.3.3. Spezifitäten der SH2-Domänen von SHP-1 und SHP-2.....	21
2.3.3.4. Entwicklung von SH2-Domänen-Effektoren	23
2.3.3.5. SH2-Domänen Effektoren der Enzymaktivität von SHP-1 und SHP-2	25
3. ZIELSTELLUNG	26
4. MATERIALIEN UND METHODEN.....	27
4.1. Materialien.....	27
4.1.1. Chemikalien, Lösungen und Puffer	27
4.1.2. Zelllinien und Bakterienstämme (<i>E. coli</i>).....	30
4.1.3. Antikörper.....	30
4.1.4. Plasmide	31
4.1.5. Sonstiges	31
4.2. Methoden	31
4.2.1. Festphasenpeptidsynthese.....	31
4.2.1.1. Darstellung der linearen Peptide.....	31
4.2.1.2. Darstellung der cyclischen Peptide.....	33

4.2.2.	Chemische Charakterisierung der Peptide.....	34
4.2.2.1.	Semipräparative HPLC.....	34
4.2.2.2.	Analytische HPLC.....	34
4.2.2.3.	Massenspektrometrie.....	34
4.2.2.4.	Dünnschichtchromatographie.....	34
4.2.2.5.	Aminosäureanalyse.....	35
4.2.3.	Modellierung der Peptidliganden.....	35
4.2.4.	Rekombinante Expression und Aufreinigung von Proteinen in <i>E.coli</i>	35
4.2.4.1.	Bakterienmedien.....	35
4.2.4.2.	Transformation von <i>E. coli</i>	36
4.2.4.3.	Herstellung von Dauerkulturen.....	36
4.2.4.4.	Expression von GST-Fusionsproteinen.....	36
4.2.4.5.	Herstellung von GST-freiem Protein.....	37
4.2.4.6.	Proteinreinigung mittels Gelfiltration.....	37
4.2.5.	Expression von SHP-1 und SHP-2 in 293T-Zellen.....	37
4.2.5.1.	Transfektion von 293T-Zellen.....	37
4.2.5.2.	Lyse der 293T-Zellen.....	38
4.2.6.	Charakterisierung der Proteine mit SDS-PAGE und Immunoblot.....	38
4.2.6.1.	SDS-PAGE nach Lämmli.....	38
4.2.6.2.	Western Blot und Immunfärbung.....	38
4.2.7.	Konzentrationsbestimmungen.....	39
4.2.7.1.	Malachitgrünassay.....	39
4.2.7.2.	Proteinbestimmung nach Bradford.....	39
4.2.7.3.	Spektralphotometrische Bestimmung der Proteinkonzentration.....	39
4.2.8.	Biologische Testung.....	40
4.2.8.1.	Phosphatase-Aktivitäts-Tests.....	40
4.2.8.2.	Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (Biacore).....	40
4.2.8.3.	Fluoreszenz-Anisotropie-Messungen.....	41
4.2.8.4.	Pulldown-Assay.....	42
5.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	43
5.1.	Auswahl und Modellierung von Peptidliganden der N-SH2-Domäne.....	43
5.2.	Darstellung der Phosphopeptidliganden.....	47
5.2.1.	Lineare Phosphopeptide.....	47
5.2.1.	Cyclische Phosphopeptide.....	52

5.3.	Biologische Testung	56
5.3.1.	Stimulation der Phosphataseaktivität von SHP-1	56
5.3.1.1.	Aktivierung der Phosphatase durch lineare Phosphopeptide	56
5.3.1.2.	Aktivierung der Phosphatase durch cyclische Phosphopeptide	62
5.3.2.	Bindungsstudien	64
5.3.2.1.	Affinität der linearen Phosphopeptide für die GST-N-SH2-Domäne	64
5.3.2.2.	Affinität der cyclischen Phosphopeptide für die GST-N-SH2-Domäne	67
5.3.2.3.	Affinität von Ros $p\text{oY}^{2267}$ für die N-SH2-Domäne	68
5.3.3.	Kompetitionsexperimente.....	69
5.3.3.1.	Cyclische Phosphopeptide als partielle Inhibitoren der Phosphataseaktivität.....	69
5.3.3.2.	Kompetitive Bindung der cyclischen Phosphopeptide zu Ros $p\text{oY}^{2267}$	71
5.3.3.3.	Theoretische Studien zur Ermittlung des Bindungsmodus ausgewählter Liganden	73
5.4.	Weitere Untersuchungen zur Regulation der Enzymaktivität mit ausgewählten Liganden	76
5.4.1.	Stimulation von SHP-1 über die N-SH2-Domäne.....	76
5.4.2.	Stimulation von SHP-1 über die C-SH2-Domäne.....	77
5.4.3.	Affinität ausgewählter Liganden für die GST-C-SH2-Domäne.....	78
5.4.4.	Alternative Bindungsstudien mit Fluoreszenz-Anisotropie	80
5.4.5.	Untersuchung der Bindung ausgewählter Phosphopeptide an SHP-1 und SHP-2 in einem <i>in vitro</i> -Pull-down-Assay	83
6.	ZUSAMMENFASSUNG	87
	LITERATURVERZEICHNIS	90
	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	103
	ERKLÄRUNG ZUR BEWERBUNG.....	104
	LEBENS LAUF	105

Abkürzungen und Symbole

Abkürzungen für Aminosäuren und –derivate wurden entsprechend den Empfehlungen des Nomenclature Committee of IUB (NC-IUB) und der IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) vorgenommen (*Eur. J. Biochem.* 183, 1984, 9-37). Die Aminosäuren und Aminosäurederivate besitzen, wenn nicht anders gekennzeichnet, L-Konfiguration.

Zusätzlich verwendete Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
Abl	Abelson protein
Abu(β Ph)	α -Amino- β -phenylbuttersäure
All	Allyl
Alloc	Allyloxycarbonyl
BCR	B cell receptor
BIT	Brain Ig-like molecule with tyrosine-based activation motifs
Blk	B-lymphocyte kinase
BLNK	B-cell linker protein
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
(Boc) ₂	Di- <i>tert.</i> -butyldicarbonat
Bp	Basenpaare
Bu ^t	<i>tert.</i> -Butyl
Btn	Biotin
Bzl	Benzyl
C2	Konservierte Domäne 2
CD	Cluster of differentiation
CDC25	Cell division cycle 25C protein
CDCP1	CUB-domain-containing protein 1
CF	5-Carboxy-fluorescein
c-Kit	Csk homologous kinase
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
CSF	Colony stimulating factor
Csw	Protein-tyrosine phosphatase corkscrew
CXCR4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4

DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DIEA	Diisopropylethylamin
DMEM	Dulbeco`s modified Eagle medium
DNA	Desoxyribonucleic acid
ECL	Enhanced chemoluminiscence
EC ₅₀	Effective concentration 50%, Konzentration eines Liganden, die eine 50% ige Aktivierung auslöst
EGF	Epidermal growth factor
Epo	Erythropoietin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular regulated kinase
FCS	Fetal calf serum
FcR	Rezeptor, der Fc-Teil (fragment crystallizable) eines Antigens bindet
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
v-Fps	Onkogen des Fujinami Sarcoma Virus
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GST	Glutathion-S-Transferase
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
He-PTP	hematopoietic protein tyrosine phosphatase
Hfe	Homophenylalanin
HOBt	N-Hydroxybenzotriazol
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IC ₅₀	inhibitor concentration 50%, Konzentration, welche eine 50% ige Hemmung auslöst
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITAM	Immunoreceptor tyrosine based activation motif
ITIM	Immunoreceptor tyrosine based inhibition motifs
Jak	Januskinase
JNK	C-jun N-terminal kinase
kb	Kilobase, 1000 Basenpaare
kDA	Kilodalton
K _i	Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes

K_M	Michaelis-Konstante
Lck	Lymphocyte Kinase
LIR	Leukocyte immunoglobulin-like receptor
LMPTP	Low molecular weight Proteintyrosinphosphatase
MALDI-MS	Matrix-unterstützte Laserdesorption/-ionisation Massenspektroskopie
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinasen
MBHA	4-Methylbenzhydrylamin
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MW	Molekulargewicht
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat, reduzierte Form
NF κ B	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
Nle	Norleucin
NGF	Nerve growth factor
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
OD	optische Dichte
PDB	Protein Datenbank
PECAM	Platelet/Endothelial cell adhesion molecule
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIR-B	Paired-Ig-like receptor B
PKC	Proteinkinase C
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
PPM	Metall-abhängige Phosphatase
PPP	Phosphoproteinphosphatase
PTB	Phosphotyrosinbinde-Domäne
PTK	Proteintyrosinkinase
PTP	Proteintyrosinphosphatase
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxy-tris(pyrrolidino)phosphoniumhexafluorophosphat
Ras	von „Rat sarcoma“
R $_f$	Retentionsfaktor
RNA	Ribonucleic acid
Ros	Onkogen des „Aviral sarcoma virus UR2“ (University of Rochester)
RU	Resonance units
SAP	Serum amyloid P

SDS	Sodiumdodecylsulfat
SH2	Src Homologie-Domäne 2
Shc	SH2-containing-Protein
SHP	Src Homologie Phosphatase
Ser(β Ph)	β -Phenylserin
SLP-65	SH2-containing leukocyte protein of 65 kDa
SPR	Surface plasmon resonance
Src	von Sarkom-auslösend
Stat	Signal transducer and activator of transcription
Syk	Spleen tyrosine kinase
Tab.	Tabelle
TCF	T cell transcription factor
TCR	T cell receptor
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilan
TNF	Tumor necrosis factor
t_r	Retentionszeit
Tyk	Tyrosine kinase
wt	Wildtyp
Yes	dem "Yamaguchi sarcoma virus" homologes Protein
ZAP70	T cell zeta chain associated protein 70 kDa

1. Einleitung

In vielen intrazellulären Signaltransduktionskaskaden, die z.B. Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zelltod regulieren, hat die reversible Phosphorylierung von Tyrosinresten in Proteinen eine entscheidende Rolle. Proteintyrosinkinasen (PTKs), die z.B. nach extrazellulärer Stimulation durch Wachstumsfaktoren oder Cytokine aktiviert werden, führen intrazellulär zu einer Erhöhung des Phosphotyrosingehaltes. Die Tyrosinphosphorylierten Proteine können u.a. Moleküle binden, die Phosphotyrosin-spezifische Proteindomänen (SH2-, PTB-, C2-Domänen) enthalten, und somit das Signal weiterleiten. Proteintyrosinphosphatasen, die Gegenspieler der PTKs, katalysieren die hydrolytische Spaltung der Phosphatgruppe. Diese Reaktion mündet entweder in der Abschaltung oder der Aktivierung einer Signalkette. Eine Regulation dieser Kaskaden durch spezifische Inhibitoren und/oder Aktivatoren eröffnet die Möglichkeit, selektiv bestimmte physiologische und pathophysiologische Prozesse zu beeinflussen. Die pharmazeutische Forschung hat deshalb in den vergangenen Jahren großes Interesse an der Entwicklung spezifischer Inhibitoren für Proteintyrosinkinasen und -phosphatasen gezeigt.

Einen interessanten Untersuchungsgegenstand in diesem Zusammenhang stellen die Phosphotyrosin-bindenden Domänen, insbesondere die Gruppe der SH2 (Src Homology 2)-Domänen, dar. Die cytosolische Proteintyrosinphosphatase SHP-1 enthält neben der katalytischen Domäne zwei SH2-Domänen. Das Enzym wird sowohl in hämatopoetischen als auch in epithelialen Zellen exprimiert und ist dort in verschiedene Signalwege involviert. Die Enzymaktivität von SHP-1 wird allosterisch über die SH2-Domänen, insbesondere die N-terminale SH2-Domäne, reguliert. Die Phosphatase kann u.a. effizient durch die Bindung eines Phosphotyrosin-haltigen Liganden an die N-SH2-Domäne aktiviert werden. Bisher ist jedoch nur unzureichend bekannt, welche strukturellen und konformationellen Determinanten eine effiziente Assoziation der Liganden bewirken und welche Aminosäuren nach Interaktion mit der Domäne die Aktivierung des Enzyms auslösen. Diese Informationen sind jedoch entscheidend für die Entwicklung von Molekülen, die die über die SH2-Domäne vermittelte Enzymaktivierung einschränken bzw. unterbinden.

Mit Hilfe synthetischer Phosphopeptide sollen in dieser Arbeit die strukturellen Anforderungen für die Bindung an die N-SH2-Domäne sowie der entsprechende Aktivierungsmechanismus von SHP-1 detaillierter untersucht werden, um damit eine Grundlage für die Entwicklung von spezifischen SHP-1-Effektoren zu schaffen.

2. Proteinkinasen und Proteinphosphatasen

Die reversible Phosphorylierung von Proteinen reguliert selektiv die Weiterleitung von Signalen. Targetproteine können an Tyr-, Ser- und Thr-Resten modifiziert werden. Während Ser/Thr-Proteinkinasen und Proteintyrosinkinasen (PTK) strukturell ähnlich aufgebaut sind und auch in der katalytischen Domäne konservierte Sequenzmotive enthalten [1, 2], unterscheiden sich Ser/Thr-Proteinphosphatasen grundlegend im Aufbau und im Katalysemechanismus von den Proteintyrosinphosphatasen (PTP). PTPs enthalten einen konservierten Cys-Rest im aktiven Zentrum. Die Ser/Thr-Phosphatasen, welche in Phosphoproteinphosphatasen (PPPs) und Metall-abhängige Phosphatasen (PPMs) unterteilt werden, nutzen zum Teil Erdalkali- oder Übergangsmetallionen zur Hydrolyse des Phosphatmonoesters [3].

2.1. Proteintyrosinphosphatasen (PTP)

PTPs stellen als Gegenspieler der PTKs eine heterologe Enzymgruppe dar. Sie sind an der Kontrolle und Regulation von Zellproliferation, Zelldifferenzierung sowie an Adhäsions- und Migrationsprozessen beteiligt [4, 5, 6]. Fehlfunktionen in der Genexpression von PTPs werden mit Krebsentstehung, Diabetes mellitus Typ II und Übergewicht assoziiert [7, 8].

2.1.1. Klassifizierung von PTPs

Nach ihrer zellulären Lokalisation werden PTPs in Rezeptor-ähnliche- und cytosolische PTPs eingeteilt [6, 9]. Eine weitere Unterteilung nach der Substratspezifität differenziert in klassische PTPs, die nur Phosphotyrosin ($p\text{oY}^1$) spalten und in dual-spezifische PTPs die ebenfalls Phosphoserin- ($p\text{oS}$) und Phosphothreonin- ($p\text{oT}$) Reste dephosphorylieren können [5, 9]. Klassische und dualspezifische PTPs werden aufgrund des ähnlichen strukturellen Aufbaus der katalytischen Domäne evolutionär von den niedrigmolekularen PTP (LMPTP) und den Phosphatasen des CDC25-Typs, die im Aufbau bakteriellen Enzymen ähneln, abgegrenzt [10]. Eine Sondergruppe stellen die Eya-Proteine dar. Nach ihrer Substratspezifität gehören sie zur Klasse der Tyr-Phosphatasen, ihr Katalysemechanismus ähnelt jedoch den Ser/Thr-Phosphatasen. Die katalytisch aktive Eya-Domäne enthält Erkennungsmotive der HAD (haloacid dehalogenase)-Hydrolasen und nutzt einen invarianten Asp-Rest sowie komplexierte Kationen zur Hydrolyse des Phosphatmonoesters [11].

¹ Darstellung nach der Seefeld-Nomenklatur [139]

Im menschlichen Genom wurden 107 PTPs identifiziert [10]. Davon gehören 38 der Gruppe der klassischen PTPs an. Die Gene der PTPs sind auf den Chromosomen 1–15 und 18–20 verteilt, größere Cluster finden sich auf den Chromosomen 1 und 12. Durch Sequenzanalyse der katalytischen PTP-Domänen konnten die klassischen humanen PTPs in 17 Gruppen unterteilt werden (Abb.1) [9]. Dabei wurde deutlich, dass Phosphatasen mit hoher Sequenzhomologie in der PTP-Domäne auch ähnliche strukturelle und funktionelle Domänen aufweisen. Während die cytosolischen PTPs nur eine katalytische PTP-Domäne enthalten, weisen eine Vielzahl der Rezeptor-ähnlichen PTPs zwei homologe Module auf. Jedoch ist nur die membran-proximale Domäne katalytisch aktiv [9].

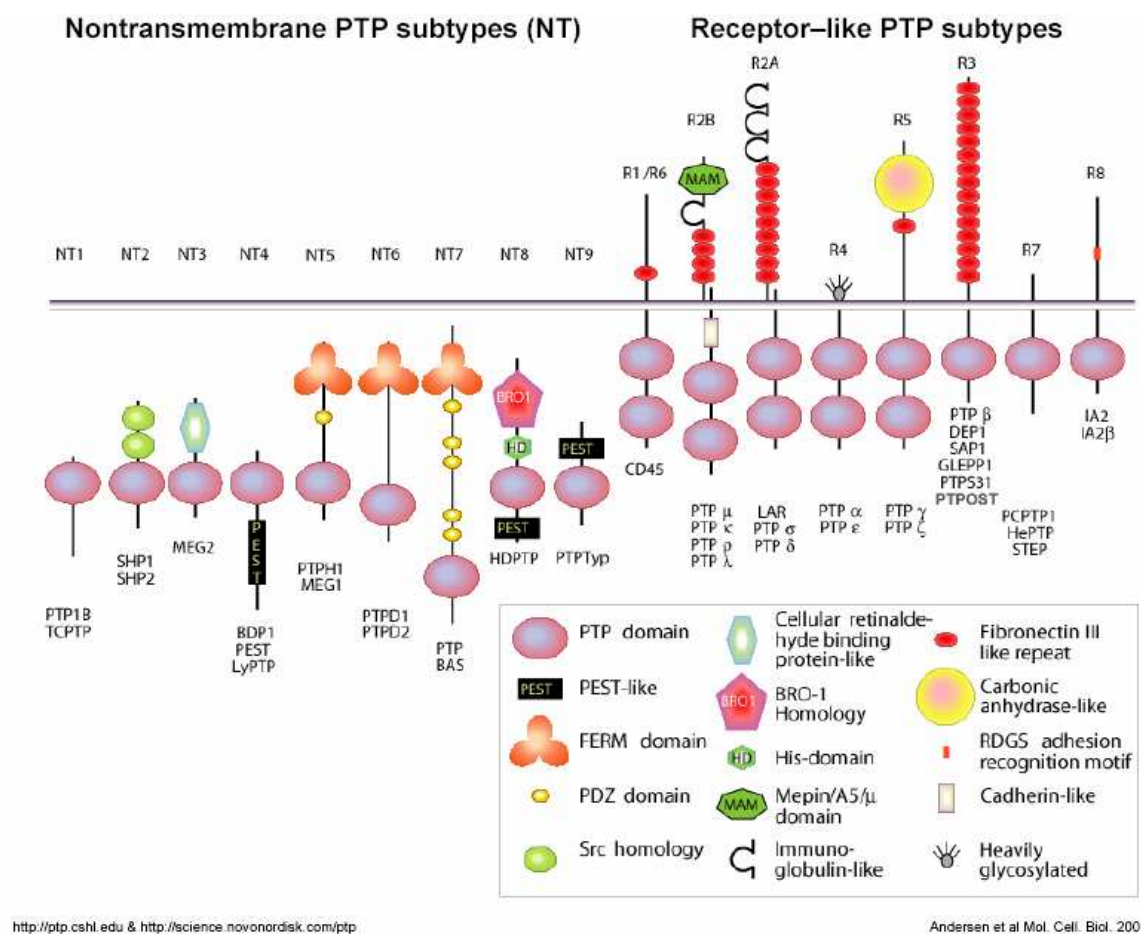


Abb. 1: Klassifizierung der klassischen PTPs nach Andersen [9].

2.1.2. Katalysemechanismus der PTPs

Alle PTPs enthalten konservierte Sekundärstrukturelemente. Die PTP-Domäne besteht aus einem zentralen Kern von vier parallelen β -Faltblättern, der von α -Helices flankiert wird. Sie besitzt 280 Aminosäuren und enthält ein zentrales VHCSXGXGR[T/S]G Motiv. Die Substrat-

Bindungstasche befindet sich zwischen dem β -Strang, der mit den Resten His und Cys endet, und der α -Helix, die mit Arg[Thr/Ser] beginnt. Der katalytische Cys-Rest ist am Boden der Tasche positioniert. Die dualspezifischen PTPs, z.B. Vaccinia H1 related PTP, haben eine flachere Substratbindungstasche (6 Å vs. 9 Å bei PTP1B) und sind deshalb in der Lage, neben *poY* auch *poS*- und *poT*-haltige Substrate umzusetzen [12]. Bedeutend ist außerdem die 30-40 Aminosäuren N-terminal der PTP-Schleife lokalisierte bewegliche WPD-Schleife, die ein konserviertes WPD_XGXP Motiv enthält [6, 9].

Die Katalyse läuft in zwei Schritten ab:

- I. Der Cys-Rest der PTP-Schleife, der durch den benachbarten His-Rest als Thiolat vorliegt, führt einen nukleophilen Angriff auf das *poY* des Substrates aus. Die Bildung des entstehenden Cysteinyl-Phosphat-Intermediats wird durch Wasserstoffbrückenbindung mit der Guanidiniumgruppe des benachbarten Arg-Rest der PTP-Schleife stabilisiert. Nach Substratbindung untergeht die WPD-Schleife eine Konformationsänderung und positioniert den Asp-Rest oberhalb der PTP-Schleife. Der positiv geladene Asp-Rest wirkt zunächst als Säure und protoniert den phenolischen Sauerstoff der Tyrosinabgangsgruppe.
- II. Der Asp-Rest fungiert anschließend als Base und leitet die Hydrolyse des Cysteinyl-Phosphat-Intermediat-Komplexes ein.

2.2. Tyrosinphosphatasen mit SH2-Domänen

Eine Untergruppe der cytosolischen Phosphatasen stellen die Tyrosinphosphatasen mit SH2-Domänen dar. Sie enthalten neben der katalytischen PTP-Domäne eine aminoterminaler Src-Homologie-2 Domäne (N-SH2) und eine carboxyterminale SH2-Domäne (C-SH2). Die Konformation dieser Module beeinflusst entscheidend die katalytische Aktivität des Enzyms. Zu den humanen Vertretern zählt man SHP-1 (HCP, PTP1C, PTPN6, SH-PTP1) und SHP-2 (Syp, PTP1D, PTPN11, SHPTP2, PTP2C). Beide Enzyme weisen eine Sequenzhomologie von ca. 60% auf [13]. Sie werden jedoch in unterschiedlichen Zellen exprimiert und lösen verschiedene zelluläre Signale aus (Abb. 2). Mutationen in SHP-1 und SHP-2 können die Entstehung von verschiedenen Tumoren begünstigen [14, 7]. Ein verändertes Expressionsniveau von SHP-1 und SHP-2 in neutrophilen Granulozyten wird mit schwerer angeborenen Neutropenie assoziiert (Kostman-Syndrom) [15].

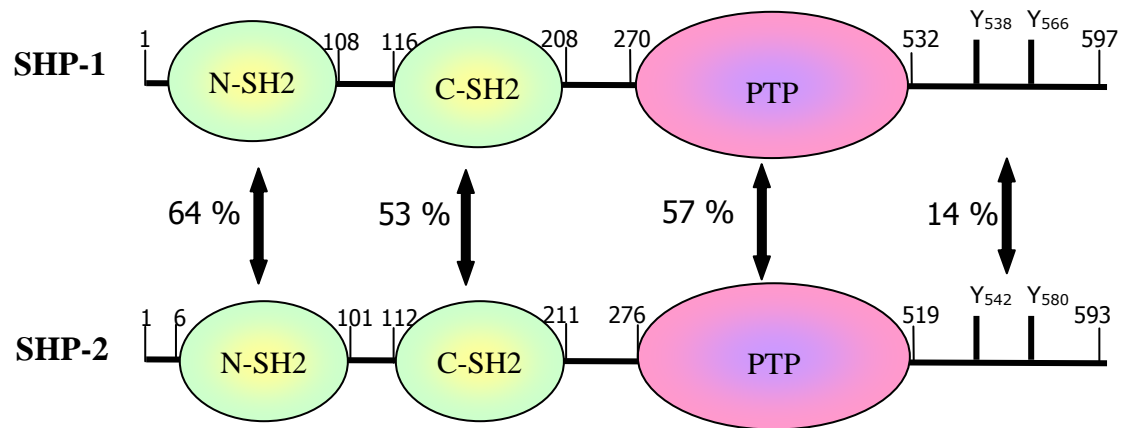


Abb. 2: Vergleich der Aminosäuresequenz mit Angabe der Sequenzhomologie der einzelnen Domänen von SHP-1 und SHP-2 [13, 16, 17].

2.2.1. SHP-1

2.2.1.1. Expression von SHP-1

Das Gen für SHP-1 ist im menschlichen Genom auf Chromosom 12 (12p13.31) lokalisiert [18] und besteht aus 17 Exons. Shen et al. [19] isolierten erstmals SHP-1 (I SHP-1) aus humanen Brustkrebszellen. Eine weitere Form von SHP-1 (II SHP-1), die vor allem in hämatopoetischen Zellen vorkommt, wurde zuerst von Plutzky et al. [20] identifiziert. Beide Konstrukte unterscheiden sich nur im N-Terminus. Dies begründet sich in der Nutzung von zwei unterschiedlichen Promotoren. In epithelialen Zellen befindet sich der Translationsstart auf dem Exon 1 und kodiert für die initiale Sequenz MLSRG (I SHP-1, 597 Aminosäuren). Die Nutzung des 7 kb stromabwärts gelegenen Promotors (Exon 2) generiert sowohl in hämatopoetischen als auch epithelialen Zellen II-SHP-1, bestehend aus 595 Aminosäuren, mit den Aminosäuren MVR im N-Terminus [21, 22]. Beide Varianten haben vergleichbare katalytische Aktivitäten [23]. Im geringen Umfang werden weitere Isoformen von SHP-1, z.B. SHP-1L, welche weitere 66 Aminosäuren im C-Terminus enthält, durch alternatives Spleißen gebildet. Diese SHP-1 Varianten weisen eine veränderte katalytische Aktivität auf [23, 24].

2.2.1.2. Struktur von SHP-1

Die dreidimensionale Struktur der PTP-Domäne von SHP-1 wurde bereits 1998 von Yang et al. [25] beschrieben. Die Struktur des gesamten Enzyms mit Ausnahme der 61 carboxyterminalen Aminosäuren wurde durch Kristallstrukturanalyse 2003 aufgeklärt und ist in Abb. 3 dargestellt [13]. Aminoterminal befindet sich mit den Aminosäuren 1-108 die N-SH2-Domäne. Die Aminosäuren 116-208 bilden die C-SH2-Domäne. Beide Module enthalten

die für SH2-Domänen typischen Sekundärelemente eines zentralen β -Faltblattmotives, das auf beiden Seiten von α -Helices flankiert ist. Die SH2-Domänen sind antennenartig auf der zentralen PTP-Domäne angeordnet deren räumliche Anordnung ist jedoch verschieden. Während die N-SH2-Domäne im Ligand-freien Zustand mit der PTP-Domäne interagiert, ist die flexible C-SH2-Domäne von der PTP-Domäne entfernt angeordnet. Die Phosphopeptid-Bindungsstellen beider SH2-Domänen sind auf der Moleküloberfläche auf der zur PTP-Domäne abgewandten Seite positioniert. Die PTP-Domäne formiert sich aus den Aminosäuren 270-532 als stark gewundenes, aus 10 Strängen bestehendes β -Faltblatt, welches auf der konvexen Seite von 4 α -Helices und auf der konkaven Seite von 2 α -Helices und einer β -Haarnadelstruktur bedeckt wird. Im inaktiven Zustand liegt die für die Katalyse bedeutende WPD-Schleife in einer halb-offenen-/halb-geschlossenen Konformation vor [25].

Die Struktur der Substrat-freien PTP-Domäne ist mit der Peptid-gebundenen Form nahezu identisch [13]. Auch die Konformation der N-SH2-Domäne der strukturhomologen SHP-2 verändert sich nach Bindung eines *poY*-Liganden nur um etwa 2,1 Å [26].

Die Bereiche aminoterminal der PTP-Domäne (Aminosäuren 232-269) bilden α -helikale Strukturen ($\alpha 0$ und $\alpha 1'$). Ohne definierte Sekundärstrukturen sind die Regionen zwischen der C-SH2- und der N-SH2-Domäne sowie der Bereich carboxyterminal der C-SH2-Domäne (Aminosäuren 209-231) angeordnet [13]. Die in diesem Model nicht mit dargestellten 61 Aminosäuren (Aminosäuren 534-595) bilden den carboxyterminalen „tail“ des Enzyms.

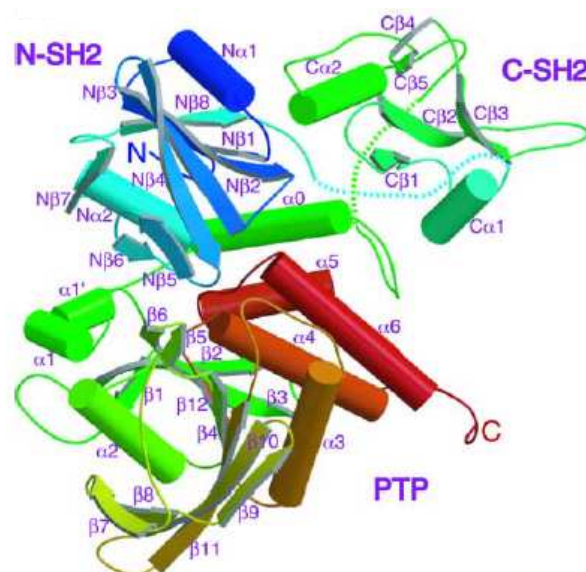


Abb. 3: Struktur von SHP-1 nach Yang [13], (RCSB-PDB: 2B30)

2.2.1.3. Substratspezifität von SHP-1

Die Substratspezifität von SHP-1-Liganden wird vor allem durch Aminosäuren aminoterminal zu *poY* bestimmt. Die Aminosäuren in Position *poY*-2 oder *poY*-3 binden in die so genannte *poY*-2 Tasche, welche von den Seitenketten der Positionen Lys³⁶², Arg²⁷⁷ und Tyr²⁷⁸ gebildet wird. Je nachdem, welcher Aminosäurerest mit der *poY*-2-Tasche interagiert, verschiebt sich auch die Lage und Konformation des *poY*-Restes des Substrates. Der *poY*-Rest bindet in eine Tasche, welche sich aus den Aminosäuren der α 1/ β 1-Schleife formiert. Weitere Spezifitäten resultieren aus der Interaktion der Aminosäuren aminoterminal von *poY*-2 mit dem β 5-Schleife- β 6-Motiv und der Assoziation der Reste carboxyterminal vom *poY* mit der α 1/ β 1-Schleife und dem α 5-Schleife/ α 6-Motiv. Ein Vergleich der Bindungseigenschaften verschiedener SHP-1-Substrate klassifizierte (L/I)_n*poY*xx(L/I/V) mit n=1, 2 als mögliche Sequenz von SHP-1-Substraten [27]. Wang et al. [28] identifizierten in einem Screening einer kombinatorischen Peptidbibliothek mit randomisierten Positionen in *poY*-1 und *poY*-2 dagegen D/Exp*poY* als optimal. Kinetische Untersuchungen einzelner Peptide dieser Sequenz bestätigten diese Aussagen. In Modellierungsstudien wurde für die PTP-Domäne ebenfalls eine Präferenz für saure Aminosäuren in den Positionen *poY*-1, *poY*-2, *poY*-3 und *poY*-4 gefunden. Eine niedrigere Affinität zeigten Peptide mit hydrophoben Aminosäuren wie z.B. Leu in *poY*-2. Auch Variationen in den Aminosäureresten carboxyterminal vom *poY* beeinflussen die Affinität. In Position *poY*+3 wird bevorzugt Phe gebunden. Als optimal für die Position *poY*+4 erwiesen sich saure Aminosäuren. Frank et al. [29] schlagen deshalb als ideale Substratsequenz (D/E)(D/E)(D/E/L)*xpoY*xx(F/ Φ)(D/E) vor. In Untersuchungen zur Dephosphorylierung verschiedener Peptidsequenzen der Rezeptortyrosinkinase Ros durch SHP-1 wurde eine Präferenz für Glu über Asp in *poY*-2 ermittelt. Innerhalb der Aktivierungsschleife von Ros können drei Tyr-Reste phosphoryliert vorliegen (Y²⁰⁰³, Y²⁰⁰⁷ und Y²⁰⁰⁸). Neben der Sequenzumgebung des *poY* übt auch die Anzahl der *poY*-Reste im Protein einen Einfluss auf die Substratspezifität aus. So wurde kürzlich gezeigt, dass dreifach- und zweifach-phosphorylierte Peptide der Ros-Sequenz effizienter dephosphoryliert werden als monophosphorylierte Liganden [30].

2.2.1.4. Regulation der katalytischen Aktivität

Die katalytische Aktivität von SHP-1 ist bei physiologischem pH-Wert niedrig. Selbst bei dem pH-Optimum des Enzyms (pH 5,5) ist die Effizienz der Dephosphorylierung des typischen niedrigmolekularen PTP-Substrates p-Nitrophenylphosphat (pNPP) verglichen mit

anderen Phosphatasen nur gering (k_{cat}/K_M liegt im Bereich $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [31]. Studien mit verschiedenen mutierten SHP-1 Konstrukten verdeutlichten, dass die SH2-Domänen sowie der C-Terminus des Enzyms regulatorisch auf die katalytische Aktivität des Enzyms bei pH 7,4 wirkt [32, 31, 33]. Die Kristallstrukturanalyse der Phosphatase zeigte, dass eine Blockierung des katalytischen Zentrums der PTP-Domäne durch den β 4- und β 5-Strang des zentralen β -Faltblattes der N-SH2-Domäne für den inhibitorischen Zustand verantwortlich ist.

Die autoinhibitorische Konformation des Enzyms kann durch verschiedene Prozesse in eine aktive Form umgewandelt werden.

1. Bindung eines monophosphorylierten Liganden an die N-SH2-Domäne

Erste Untersuchungen mit SHP-1-Mutanten verdeutlichten, dass die Interaktion zwischen einem Phosphopeptid und der N-SH2-Domäne entscheidenden Einfluss auf die Aktivität des Enzyms hat [33, 34]. Die Bindung eines *poY*-Liganden, z.B. die Sequenz des Epo-R *poY*⁴²⁹, löst einen Konformationswechsel des Enzyms und eine etwa 30- bis 60-fache Erhöhung der Phosphataseaktivität aus. Die Bindung eines monophosphorylierten Liganden an die C-SH2-Domäne führt dagegen nur zu einer minimalen Aktivierung [33, 34, 13]. Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind keine Daten vorhanden, die beschreiben, welche strukturelle Umordnung nach Bindung eines Liganden für die Dissoziation der N-SH2-Domäne von der PTP-Domäne verantwortlich ist. In Molecular-Dynamics-Studien wurde gezeigt, dass sich die Flexibilität des carboxyterminalen Bereiches der N-SH2-Domäne (Aminosäuren 57-95) von SHP-2 im Ligand-gebundenen Zustand verringert. Eine flexible Konformation dieses Bereiches ist jedoch für die Interaktion der N-SH2-Domäne mit der PTP-Domäne notwendig. Eine Verringerung der konformationellen Flexibilität der N-SH2-Domäne nach Bindung eines *poY*-Liganden ist möglicherweise für das Lösen des Komplexes und für die Öffnung der Substratbindungsstelle verantwortlich [26]. Für die strukturhomologe SHP-2 wurde durch Superpositionierung der Liganden-gebundenen und der freien N-SH2-Domäne gezeigt, dass nach Assoziation eines *poY*-Liganden die α B-Helix (entspricht α 2-Helix in SHP-1) und die β D'-, β E- und β F-Stränge (entspricht den β 4-, β 5- und β 6-Stängen in SHP-1) der N-SH2-Domäne den Konformationswechsel vollziehen [35, 13].

Die Stärke der Änderung der katalytischen Aktivität von SHP-1 ist konzentrationsabhängig und in der Sequenz des monophosphorylierten Liganden begründet.

2. Bindung eines biphosphorylierten Liganden

Biphosphorylierte Liganden führen *in vitro* verglichen mit monophosphorylierten zu einer 10-fach stärkeren Aktivierung von SHP-1 [36]. Diese Liganden können mit beiden SH2-Domänen simultan interagieren. Die maximale Aktivität von Konstrukten mit fehlender C-SH2-Domäne oder Punktmutation des Arg β B5 Restes in der C-SH2-Domäne (R136K) ist verringert [37, 38, 34]. Interaktionspartner der SH2-Domänen von SHP-1 in Immunzellen enthalten meist benachbarte sogenannte „immunoreceptor tyrosine based inhibition motifs“ (ITIMs) mit einer V/L/IxYxxL/V Konsensussequenz [39], die nach Aktivierung des Rezeptors als biphosphorylierter Ligand vorliegt [140]. Der Abstand zwischen 2 ITIMs kann zwischen ca. 19 und 31 Aminosäuren betragen [40]. Für SHP-2 ist als optimale Distanz zwischen zwei *poY*-Resten ca. 40 Å ermittelt worden [41]. Es wird angenommen, dass die flexible C-SH2-Domäne als „Antenne“ für die Suche von Phosphopeptiden fungiert. Wahrscheinlich führt die Bindung eines Liganden an die C-SH2-Domäne zu Konformationsänderungen im Enzym, die die Position der N-SH2-Domäne so verändern, dass ein zweiter Ligand effizienter gebunden werden kann. Die Interaktion des zweiten *poY*-Liganden mit der N-SH2-Domäne führt zur Freilegung des katalytischen Zentrums der PTP-Domäne. Möglicherweise ist die Positionsänderung des SH2-Domänen-Motivs durch die flexible C-SH2-Domäne verstärkt und die PTP-Domäne besser zugänglich [13].

3. Tyr-Phosphorylierung im C-Terminus

Da die Kristallstruktur von SHP-1 nur ohne die carboxyterminalen 61 Aminosäuren vorliegt, sind bisher keine Informationen über die Struktur oder mögliche Interaktionen des C-Terminus mit den restlichen Proteindomänen bekannt. Bereits 1993 wiesen Zhao et al. [32] auf die Bedeutung des C-terminalen „tails“ im Aktivierungsprozess hin. In Phosphataseaktivitätstests zeigte die um die 35 carboxyterminalen Aminosäuren verkürzte SHP-1 verglichen dem Wildtyp eine 34-fach erhöhte Aktivität. Eine Mutante mit den fehlenden 60 carboxyterminalen Aminosäuren verhielt sich dem Wildtyp vergleichbar [35].

Als mögliche Tyrosin-Phosphorylierungsstellen im C-terminalen „tail“ wurden Y^{536/538} und Y^{564/566} identifiziert. Die Phosphorylierung durch verschiedene Kinasen wie z.B. Lck [42], Src [29], IR [43], Lyn [44] und EGFR [45] führt zur Erhöhung der enzymatischen Aktivität von SHP-1. Synthetische SHP-1-Konstrukte, die nicht hydrolysierbares Di-fluorophosphonomethylen-L-phenylalanin anstelle des *poY*⁵³⁶ im C-Terminus enthalten, zeigten eine 8-fach erhöhte Phosphataseaktivität. Eine Modifikation in Position Y⁵⁶⁴ resultierte dagegen nur in einer geringen (1,6-fach) Änderung der katalytischen Eigenschaft. Es wird

angenommen, dass die Erhöhung der enzymatischen Aktivität sich in einer intramolekularen Interaktion des phosphorylierten Y⁵³⁶ mit der N-SH2-Domäne begründet. Diese Bindung löst einen Konformationswechsel aus und die PTP-Domäne ist für Substrate zugänglich. Die Aktivitätsänderung, ausgelöst durch phosphoryliertes Y⁵⁶⁴, ist auf eine Interaktion mit der C-SH2-Domäne zurückzuführen [46]. Wie bereits erwähnt, führt die Bindung eines monophosphorylierten Liganden an die C-SH2-Domäne von SHP-1 nur zu einer geringen Aktivierung [34]. Auch in stimulierten T-Zellen konnte keine Änderung der katalytischen Aktivität nach Phosphorylierung von Y⁵⁶⁴ detektiert werden [42].

4. *Phospholipid-Interaktionen mit dem C-Terminus und den SH2-Domänen*

Die 43 Aminosäuren im distalen C-Terminus binden direkt an Phosphatidsäure, in geringerem Maße auch an Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat. Die Assoziation führt, möglicherweise durch Änderungen der Sekundärstruktur des Enzyms, zur 15-20-fach verstärkten Dephosphorylierung des synthetischen Substrates pNPP. Die Aktivierung von SHP-1 durch anionische Phospholipide ist nur im pH-Bereich 5,8 bis 7,4 wirksam und auf eine Erniedrigung des K_M-Wertes zurückzuführen [47]. Im Gegensatz zu SHP-1 fehlt SHP-2 diese hochaffine Phospholipidbindungsstelle. Beide Phosphatasen besitzen dagegen einen niedrigaffinen weiteren Bindungsort innerhalb des Tandem-SH2-Domänen-Motivs [47].

Die Aktivität von SHP-1 kann durch folgende Prozesse negativ reguliert werden.

1. *Ser-Phosphorylierung im C-Terminus*

In humanen Blutplättchen und neutrophilen Granulozyten wurde nach Stimulation eine PKC-vermittelte Ser-Phosphorylierung im C-Terminus nachgewiesen [48, 49]. Jones et al. [48] beschreiben, dass in humanen Blutplättchen SHP-1 durch Interaktion mit einem Multienzymkomplex konstitutiv aktiv vorliegt und nach Zellaktivierung spezifisch durch PKC α an S⁵⁹¹ phosphoryliert werden kann. Diese Modulation reguliert die Aktivität des Enzyms negativ, z.B. wird Vav1, ein spezifisches Substrat von SHP-1, nicht mehr dephosphoryliert.

2. *Oxidation des katalytischen Cys-Restes*

Die Wirkung von Sauerstoffradikalen und reaktiven Stickstoffverbindungen auf die enzymatische Aktivität der Phosphatase ist für viele PTPs beschrieben worden [7]. Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und andere reaktive Sauerstoffspezies können den Cys-Rest im aktiven Zentrum der PTP-Domäne zu Sulfensäure oxidieren. Diese Reaktionen sind

reversibel, weitere Oxidationsschritte, die zur Bildung von Sulfin- und Sulfonsäure führen, sind irreversibel [7]. Sauerstoffradikalbildner wie H_2O_2 werden jedoch unter physiologischen Bedingungen durch Glutathion-Peroxidase und Katalase abgebaut. Obwohl die Reaktionsgeschwindigkeit der PTPs mit H_2O_2 um etwa 10^5 mal langsamer als die Peroxidasereaktion ist, wurde in Zellen nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF) eine endogene H_2O_2 -Produktion und eine reversible Oxidation des Cys⁴⁶³ von SHP-2 festgestellt [50]. Vermutlich kann z.B. die NADPH-Oxidase, wenn sie in räumlicher Nähe zur Phosphatase lokalisiert ist, unter physiologischen Bedingungen ausreichende Konzentrationen an H_2O_2 generieren. Im zweiten Schritt folgt nun, katalysiert durch die Cystein-Oxidase, die Oxidation des Cys-Restes im katalytischen Zentrum der PTP. Das PTP-Sulfenat-Intermediat kann durch Glutathionylierung vor weiteren Oxidationsschritten bewahrt werden. Eine andere Möglichkeit der Oxidation des Cys-Restes wäre die Reaktion mit oxidiertem Glutathion (GSSG), ebenfalls unter Bildung eines gemischten Disulfid-Cystein-Komplexes [51]. Die Hemmung der katalytischen Aktivität der PTPs kann zur konstitutiven Aktivierung von Kinasen z.B. des MAPK-Signalweges führen. So wurde in T-Lymphozyten nach Stimulation mit H_2O_2 eine Inhibierung der Aktivität von SHP-1, CD45 und HePTP und eine verstärkte Phosphorylierung von p38, ERK und JNK detektiert. Durch Transfektion von wtSHP-1 wurde die Hyperphosphorylierung von ERK und JNK aufgehoben [52]. In Untersuchungen von Cunnick et al. [53] waren 0,2 mM bis 2 mM H_2O_2 nötig, um *in vitro* eine 73% - 99% ige Inhibierung von SHP-1 zu erreichen. Niedrige Dosen an oxidativem Stress generieren auch eine transiente Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen NO-Synthetasen. Barrett et al. [54] beschreiben, dass durch geringe Mengen an H_2O_2 NO-Synthetasen in der Lage sind, SHP-1 reversibel am Cys⁴⁵³ zu S-Nitrosylieren und die Aktivität des Enzyms zu reduzieren.

2.2.1.5. Biologische Funktion von SHP-1

Natürliche Mutationen im SHP-1 Gen (Mausmodelle)

Die Untersuchung von zwei Mausmodellen, die Mutationen im SHP-1 Gen aufweisen, hat wesentlich zur Aufklärung der Funktion von SHP-1 beigetragen. Die sogenannten motheaten/motheaten (me/me) und viable motheaten/viable motheaten (me^v/me^v) Mäuse zeigen schwerwiegende Störungen in der Entwicklung des Immunsystems und der Hämatopoese [55, 56, 57]. Ursache der me/me-Mutation ist die Deletion eines Cytidinrestes innerhalb der Sequenz der N-SH2-Domäne. Dies schafft eine zusätzliche Spleiß-Donorstelle, die zur Änderung des Leserasters und zur Entfernung von 101 Basenpaaren (Position 226-326

der c-DNA) führt. In Position 408 der c-DNA kommt es zum Abbruch der m-RNA-Synthese durch Einführung eines Stopp-Codons. Das Produkt des me/me SHP-1-Gens besteht deshalb nur aus etwa 100 Aminosäuren. Eine Transversion von Thymin zu Adenin innerhalb der Sequenz der PTP-Domäne ist der Grund für die me^v/me^v Mutation. Es kommt zur Zerstörung einer Spleiß-Donorstelle und zur Aktivierung einer kryptischen Spleißstelle. Dies hat entweder eine Insertion (69 Basenpaare) oder Deletion (15 Basenpaare) zur Folge. Das Leseraster wird nicht verändert. Die Veränderungen innerhalb der Sequenz der PTP-Domäne führen zur Verringerung der PTPase-Aktivität des Proteins auf etwa 25% [58].

Funktion von SHP-1 in myeloiden Zellen

In histologischen Untersuchungen wiesen Mäuse mit dem me/me Genotyp eine signifikant erhöhte Anzahl an undifferenzierten Leukozyten auf. Akkumulationen von neutrophilen Granulozyten finden sich im subepidermalen Gewebe der Haut, größere Ansammlungen von Makrophagen sind im Lungengewebe vorhanden [55]. Diese Symptome ließen vermuten, dass SHP-1 in myeloiden Zellen vor allem als negativer Regulator die Proliferation, Differenzierung und Apoptose beeinflusst. Biochemische Analysen wiesen u.a. eine Funktion von SHP-1 in Signalwegen des IL-3-Rezeptors [59], des CSF-1-Rezeptors [60], des G-CSF-Rezeptors [61] und des c-Kit-Rezeptors auf [62].

Als Interaktionspartner für die SH2-Domänen von SHP-1 dienen vor allem Immunrezeptoren mit einem inhibitorischen „ITIM“-Motiv. In Monozyten führt die Bindung von SHP-1 an die inhibitorischen LIR1- und LIR2- Rezeptoren zur Dephosphorylierung des assoziierten FcγRI-Rezeptors und zur Hemmung der intrazellulären Ca²⁺-Mobilisierung [63]. Die Assoziation der ITIM-Motive in den murinen Proteinen BIT und PIR-B mit SHP-1 löst in Makrophagen die Rekrutierung von SHP-1 zum CSF-1-Rezeptor/Bit-Komplex und die Dephosphorylierung des Rezeptors, von BIT und PIR-B aus [64]. Weitere ITIM-haltige Interaktionspartner sind CD33 in myeloiden Vorläuferzellen [65] und gp49 in murinen Mastzellen [66].

Neben den ITIM-Sequenzen können für SHP-1 auch ITAM-Bindungsstellen („immunoreceptor tyrosine based activation motif“) als Interaktionspartner fungieren. In Monozyten wird eine Interaktion der SHP-1 N-SH2-Domäne mit einer phosphorylierten ITAM-Sequenz des aktivierten FcγRIIa-Rezeptors beschrieben. Die aktivierte Phosphatase kann nun Syk, p85 und p62dok dephosphorylieren, die Transkriptionsrate von NFκB-abhängigen Genen verringern und die Produktion von entzündlichen Cytokinen modulieren [67]. In Mastzellen wurde SHP-1 sowohl als positiver als auch negativer Regulator charakterisiert. Die Überexpression von SHP-1 in RBL-2H3-Zellen (basophile Leukämie-

Zellen der Ratte) reguliert die Tyr-Phosphorylierung vom FcεRI-Rezeptors und Syk negativ, aber moduliert die Phosphorylierung von JNK und damit verbunden die selektive Expression von TNF-α positiv. Geringe enzymatische Aktivität von SHP-1 wird mit invasiven Entzündungsreaktionen assoziiert [68].

In neutrophilen Granulozyten wirkt SHP-1 proapoptotisch und reguliert die Signalweiterleitung des GM-CSF- und IL-3-Rezeptor negativ. Nach Aktivierung von Todesrezeptoren der TNF/NGF-Familie interagiert SHP-1 mit einem phosphorylierten YxxL-Motiv innerhalb der cytoplasmatischen Todes-Domäne [69]. Die aktivierte SHP-1 ist nun in der Lage, die Kinase Lyn zu dephosphorylieren und deren Signaltransduktion zu unterbrechen. Vermutlich kann SHP-1 auch andere anti-apoptotische Signalmoleküle wie PI3K und Tyk dephosphorylieren und so die Anzahl an neutrophilen Granulozyten am Entzündungsort begrenzen [70].

SHP-1 beeinflusst auch die Erythropoese. Über die N-SH2-Domäne interagiert SHP-1 mit dem phosphorylierten Y⁴²⁹ des aktivierten Epo-Rezeptors und ist in der Lage, den Rezeptor selbst [71] und am Rezeptor assoziiertes Jak2 zu dephosphorylieren [72]. Jak2 kann auch direkt, SH2-Domänen unabhängig, mit SHP-1 interagieren und dephosphoryliert werden. In Studien mit einem SHP-1 Konstrukt, mutiert in den SH2-Domänen (R30K, R136K) wurde jedoch deutlich, dass die Interaktion von SHP-1 mit dem Epo-Rezeptor die Dephosphorylierung von Jak2 potenziert [73]. Die Expression von SHP-1 verringert die DNA-Bindungsfähigkeit von Stat5a/b, einem Substrat von Jak2, und wird assoziiert mit einer verminderten Differenzierungsrate der Zellen [74].

Funktion von SHP-1 in lymphatischen Zellen

In me/me-Mäusen sind die primär-lymphatischen Organe in ihrer Struktur und Größe verändert. Der Thymus ist stark verkleinert und im Knochenmark akkumulieren unreife neutrophile Granulozyten. Die sekundären lymphatischen Gewebe, Milz und Lymphknoten, sind vergrößert und enthalten mehrkernige Riesen-Zellen [55]. Die Menge an typischen B-Lymphozyten ist dezimiert, dagegen findet man eine Überexpression an autoreaktiven CD5⁺-positiven B-Zellen [75, 76]. Die Funktion von T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) ist eingeschränkt [77, 78]

Als zelluläre Interaktionspartner von SHP-1 in B-Lymphozyten wurden der B-Zell-Rezeptor [79], das Adaptorprotein BLNK [80], die Oberflächenproteine CD22 [81] und CD72 [82] und PIR-B (murin) [83] identifiziert. In ruhenden B-Lymphozyten assoziiert SHP-1 konstitutiv mit dem B-Zell-Rezeptor und dephosphoryliert die Ig-α/Ig-β-Ketten des Rezeptors. Die Bindung eines Antigens an den Rezeptor führt zur raschen Dissoziation des Komplexes [79]. Die nun

folgende Aktivierung der Kinasen Lck und Syk führt zur Phosphorylierung verschiedener ITAM- und ITIM-haltiger Rezeptoren. Durch Rekrutierung von SHP-1 via SH2-Domänen an die inhibitorischen Co-Rezeptoren CD22, PIR-B (murin) sowie an das Scaffolding-Protein BLNK/SLP-65 wird die Phosphatase aktiviert. SHP-1 kann nun selektiv ITAM-Motive und Syk dephosphorylieren [84, 85] und die B-Zell-Rezeptor-vermittelte Aktivierung der MAP-Kinase und die Ca^{2+} -Mobilisierung negativ regulieren. Die Funktion der CD72/SHP-1-Interaktion wird kontrovers diskutiert. Wu et al. [82] detektierten nach Assoziation der Tandem-SH2-Domäne von SHP-1 mit Y⁷ und Y³⁹ von CD72 und der Dephosphorylierung des Rezeptors eine Induktion der Proliferation. Adachi et al. [86] klassifizierten CD72 als negativen Regulator des B-Zell-Rezeptor-Signalweges.

Obwohl alle T-Lymphozyten-Subpopulationen in me/me-Mäusen vorkommen werden, [92] ist die prozentuale Verteilung der T-Zellpopulation verändert. So entwickeln me/me-Mäuse verstärkt CD4⁺/CD25⁺-T-Zellen [87]. Die Bindung eines Antigens an den T-Zellrezeptor (TCR) und CD4-Co-Rezeptor resultiert in der Lck- und ZAP70-vermittelten Phosphorylierung von Signalmolekülen. Da bei einer Mutation im SHP-1-Gen T-Lymphozyten hypersensitiv auf Stimulation mit anti-CD3 reagieren und eine verstärkte Proliferation zeigen, wird eine negativ-modulierende Funktion von SHP-1 auf den TCR postuliert [86]. Carter et al. [89] konnten zeigen, dass stimulierte T-Zellen eine verstärkte IL-2 Produktion aufweisen. SHP-1 reguliert auch direkt die IL-2-Rezeptor vermittelte Differenzierung negativ. So bindet SHP-1 nach IL-2 Stimulation an den IL-2-Rezeptor und dephosphoryliert IL-2R β sowie assoziiertes Jak1 und Jak3 [90]. In CD4-positiven anti-CD3 stimulierten T-Zellen von me/me-Mäusen ist auch die Aktivität von Lck und Fyn erhöht [91]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass 20% - 30% von SHP-1 konstitutiv in „lipid rafts“ lokalisiert ist. „Lipid rafts“ sind Glykosphingolipid- und Cholesterol-angereicherte Mikrodomänen der Plasmamembran, welche als Plattform für verschiedene Signalkomplexe dienen. Es wurde deutlich, dass nur dieser Teil von SHP-1 in der Lage war, nach Stimulation den ebenfalls innerhalb der „lipid rafts“ befindlichen CD3-Rezeptor zu dephosphorylieren und die IL-2 Produktion zu hemmen [92]. Sowohl in T-Lymphozyten als auch in Monozyten wurde eine Interaktion zwischen phosphorylierter SHP-1 und Vav, Grb2 und mSos detektiert. SHP-1 fungiert im Proteinkomplex möglicherweise als Adaptorprotein und beeinflusst die Ras-Aktivierung [93]. Weitere Interaktionspartner sind der ITIM-haltige-Co-Rezeptor CD5 [94, 88], der Chemokin-Rezeptor CXCR4 [95] und das in verschiedenen hämatopoetischen Zellen exprimierte Adhäsionsprotein PECAM-1/CD31 [96].

SHP-1 reguliert die Aktivität von verschiedenen ITIM-haltigen KIRs (inhibitorischer Killer-Zellen-Rezeptor) in NK-Zellen und zytotoxischen T-Lymphozyten negativ. Die lytische

Aktivität der Zellen wird nach Bindung von MHC-Klasse-1-Molekülen an KIRs durch Aktivierung von SHP-1 inhibiert. ITIM-haltige KIR-Rezeptoren sind z.B. p58 und p70 [97] und CD94/NKG2A [98, 99].

Funktion von SHP-1 in Epithelzellen

Über die Rolle von SHP-1 in Epithelzellen ist im Vergleich zu hämatopoetischen Zellen weniger bekannt. Als Interaktionspartner sind u.a. die Rezeptortyrosinkinasen EGFR [100] und Ros [101] beschrieben worden.

Erste Untersuchungen der EGFR-SHP-1 Interaktion zeigten, dass beide SH2-Domänen an der Bindung an den phosphorylierten Rezeptor beteiligt sind [38]. Die Analyse von YF-Mutanten des EGFR identifizierte Y¹¹⁷³ als Bindungsstelle für die N-SH2-Domäne von SHP-1, der Bindungspartner für die C-SH2-Domäne konnte nicht charakterisiert werden. Die reduzierte Bindung von SHP-1 an die YF-Mutante des Rezeptors resultierte in einer verringerten Hemmung der EGFR-vermittelten MAPK-Aktivierung [100]. SHP-1 interagiert und dephosphoryliert nach EGF-Stimulation das Adhäsionsproteins p120^{Ctn} und ist möglicherweise an der Regulation der Zell-Zell-Adhäsion beteiligt [102]. Die EGF-Stimulation von 431-Zellen führt zu einer SHP-1-vermittelten Dephosphorylierung des EGF-Rezeptors und einer verringerten DNA-Bindungsfähigkeit von Stat1/Stat3 [103].

Die epitheliale Variante von SHP-1 ist aufgrund einer nuklearen Lokalisations-Sequenz (NLS) im C-Terminus (KRK-Motiv) auch im Zellkern vertreten und kann mit nuklearen Proteinen interagieren [104]. In einigen Zelllinien liegt die NLS in ruhenden Zellen vermutlich blockiert vor, denn erst nach Aktivierung, z.B. durch EGF, ist SHP-1 in der Lage, vom Zytoplasma in den Nukleus zu wandern [105]. In intestinalen Epithelzellen ist SHP-1 dagegen primär nuklear lokalisiert und kann durch Bindung und Dephosphorylierung von β -Catenin die β -Catenin/TCF induzierte Transkription inhibieren. Erhöhte SHP-1 Aktivität korrelierte mit Zellzyklus-Arrest und Induktion der Differenzierung [106]. In verschiedenen Zelllinien wie A431 (humane epidermoide Karzinomzellen) und HaCaT (humane immortalisierte Keratinozyten) assoziiert SHP-1 mit perinuklearen Strukturen, z.B. dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) [103]. Wahrscheinlich bindet SHP-1 über SH2-Domänen an *poY*-Interaktionspartner im ER. Als mögliche Substrate im ER dienen verschiedene RTK. SHP-1 beeinflusst durch deren Dephosphorylierung, z.B. von FLT-3, deren Reifung und Translokation in der Zelle [107].

SHP-1 assoziiert auch unter basalen Bedingungen mit dem Somatostatin-Rezeptor-Subtyp 2 (sst2). Nach Stimulation mit Somatostatin wird die SHP-1-Rezeptor-Interaktion transient

verstärkt. Nach Dissoziation des Komplexes kann die aktivierte SHP-1 nun spezifische Substrate, z.B. EGFR, dephosphorylieren [108].

Männliche me^v/me^v -Mäuse sind aufgrund von Defekten in der Spermienreifung und der Differenzierung des Nebenhodens steril. Es konnte gezeigt werden, dass die Rezeptortyrosinkinase Ros in Epididymis-Zellen hyperphosphoryliert vorliegt. *In vitro* Studien charakterisierten Ros poY^{2267} als direkten hochaffinen Bindungspartner für die N-SH2-Domäne. Die Überexpression von SHP-1 und Ros führte in HEK293-Zellen und NIH-3T3-Zellen (murine Fibroblasten) zur Dephosphorylierung von Ros und Hemmung der Proliferation [101].

Mutationen und posttranskriptionelle Veränderungen im humanen SHP-1 Gen

Störungen der Genexpression von SHP-1 werden mit der Entstehung von Krebs assoziiert. In verschiedenen humanen Lymphoma- und Leukämiezelllinien ist die Expression von SHP-1 reduziert. Die Analyse der Promotorregion des SHP-1-Gens identifizierte verschiedene hypermethylierte CpG-Inseln in Zellen von Patienten mit akuter T-Zell-Leukämie, akut-lymphatischer-, akut-myeloischer-, chronisch-myeloischer Leukämie, NK/T-Zell-Lymphom und multiplem Myelom [109, 110, 111, 112]. Methylierte CpG-Nukleotide werden mit einer Transkriptionsrepression assoziiert [110]. *In vitro* Studien mit U266-Myeloma-Zelllinien zeigten, dass die Methylierung im SHP-1-Promotorbereich zu einer erniedrigten SHP-1 Expression und konstitutiven Aktivierung von Stat3 führt [111].

Posttranskriptionelle Basenmodifikationen der mRNA können Veränderungen der Proteinsequenz oder eine Verschiebung des Leserasters bewirken. In Patienten mit akut-myeloischer Leukämie wurden zwei verschiedene Transkripte von SHP-1 gefunden. Die A→G Transversion in Position A⁷⁸⁶⁶, innerhalb der Sequenz der N-SH2-Domäne, führt vermutlich zu Veränderungen des Leserasters und zur Bildung eines zweiten, 251 Bp-längeren SHP-1-Transkriptes. Es wird angenommen, dass bei der Translation dieses Intron-3-haltigen Transkriptes ein nicht-funktionelles Protein entsteht und deshalb die Dephosphorylierung onkogener Proteine reduziert ist [113].

2.3. Regulatorische Phosphotyrosin-bindende Proteindomänen

Regulatorische Proteindomänen sind stabile, kompakte, globuläre Einheiten aus verschiedenen Super-Sekundärstrukturen, verbunden durch ein flexibles Polypeptidelement. Sie können aus 60 bis 130 Aminosäuren bestehen und sind als Adaptordomänen u.a. an der Protein-Protein- (Src Homologie Domänen, SH-Domäne) und Protein-Phospholipid-Interaktion (Pleckstrin-Homologie-Domäne, PH-Domäne) beteiligt. Sie spielen eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion [114].

Nach Phosphorylierung von Signalproteinen können die *poY*-Motive durch Proteine mit Src-Homologie 2- (SH2)-, Phosphotyrosinbinde- (PTB)- oder C2-Domänen gebunden werden (Abb. 4). Die Bindung an diese regulatorischen Domänen löst entweder die Aktivität des Signalproteins aus oder dient der Rekrutierung weiterer Proteinmoleküle. Obwohl alle drei Domänen *poY*-Liganden binden, unterscheiden sie sich in Struktur und Ligandenspezifität.

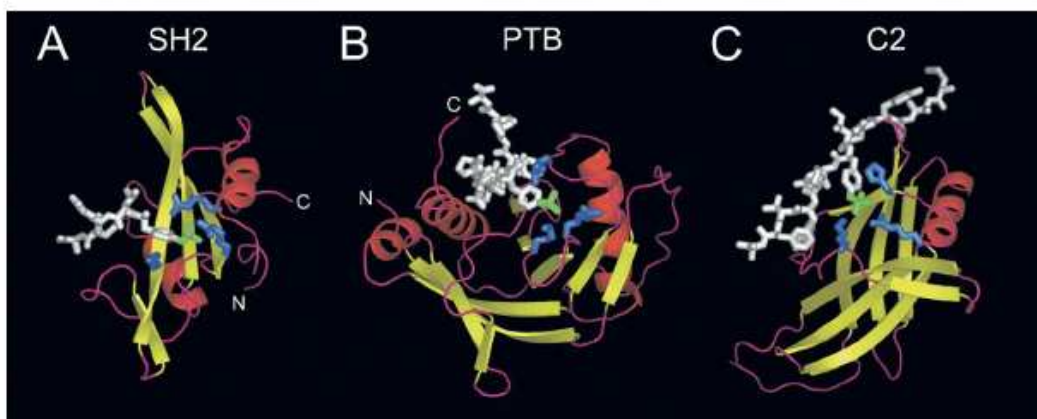


Abb. 4: Kristallstruktur von SH2- (A), PTB- (B) und C2-Domäne (C) mit komplexiertem Peptidliganden [115].

2.3.1. PTB-Domänen

Die PTB-Domäne wurde erstmals im Shc-Protein identifiziert mit einer Selektivität gegen ein NP x *poY*-Motiv [116, 117]. Im Gegensatz zur SH2-Domäne bindet die PTB-Domäne selektiv die Aminosäuren aminoterminal vom *poY*. Die Liganden werden in einer L-Form gebunden. Die Interaktionsfläche zwischen Ligand und Domäne ist im Vergleich zur SH2-Domäne größer. PTB-Domänen sind ausschließlich Bestandteile verschiedener Adaptorproteine, die entweder juxtamembranal oder an der Membran selbst lokalisiert sind. Eine Spezifität für *poY*-Liganden ist nicht bei allen PTB-Domänen vorhanden. So binden einige PTB-Domänenhaltige Proteine wie z.B. X11/Mint [118] oder Dab1 [119] *poY*-unabhängig Liganden mit einem NP x Y-Motiv. Alle PTB-Domänen enthalten als zentrales Motiv sieben antiparallele β -Stränge, die zwei orthogonale β -Faltblätter bilden. Dieses β -Sandwich-Motiv wird

carboxyterminal von einer α -Helix begrenzt [120]. Die Architektur der PTB-Domänen ist der der Pleckstrin-Homologie-Domänen homolog, weshalb diese Struktur auch als „PH-Superfold“ bezeichnet wird [121]. Neben der Bindung von Phosphopeptiden können PTB-Domänen auch mit anionischen Phospholipiden interagieren [122]. Die Phospholipidbindungstasche ist von der Peptidbindungstasche entfernt angeordnet und fungiert als unabhängige Subdomäne innerhalb der PTB-Domäne.

2.3.2. C2-Domänen

Die konservierte Domäne 2 (C2-Domäne) wurde ursprünglich in klassischen Proteinkinasen C (PKC) als Ca^{2+} abhängiges Phospholipidbindungsmodul identifiziert. Die Bindung eines Phospholipids resultiert in der Aktivierung der benachbarten Kinase-Domäne [123]. Neben der Phospholipidbindung ist die C2-Domäne auch an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt. Kürzlich wurde die C2-Domäne der PKC δ als *poY*-Bindedomäne charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Src-vermittelte Phosphorylierung von CDCP1 die Rekrutierung von PKC δ an den binären Komplex bewirkt. Die C2-Domäne von PKC δ interagiert nun mit dem phosphorylierten Y⁷⁶²-Rest von CDCP1 [124]. C2-Domänen bestehen aus acht β -Strängen, die zwei β -Faltblätter bilden [125]. Gegenüber anderen C2-Domänen sind in der C2-Domäne von PKC δ nur signifikante Unterschiede im Bereich der Phosphotyrosinbindungsstelle vorhanden. Die Kristallstruktur der Peptid-komplexierten C2-Domäne von PKC δ verdeutlicht, dass der Ligand in einer gestreckten Konformation gebunden wird. Der größte Anteil in der Bindung resultiert aus der Einpassung des *poY*-Restes in eine *poY*-Bindungstasche. Die optimale Bindungssequenz für die C2-Domäne von PKC δ ((Y/F)(S/A)(V/I)*poY*(Q/R)x(Y/F)x) zeigt, dass sowohl für Aminosäuren amino- als auch carboxyterminal vom *poY* eine Sequenzspezifität besteht [124]. Unklar ist noch, ob weitere C2-Domänen *poY*-Bindemodule darstellen.

Da in dieser Arbeit die Charakterisierung der Regulation der PTP SHP-1 durch SH2-Domänen-Liganden im Vordergrund stand, soll nun im folgenden Abschnitt näher auf die Struktur, Klassifikation und Spezifitäten der SH2-Domänen eingegangen werden.

2.3.3. SH2-Domänen

Mit der Charakterisierung der Struktur einer viralen zytoplasmatischen Tyrosinkinase des Fujinami sarcoma virus p130^{gag-fps} (v-Fps) gelang es auch, die Bedeutung eines etwa 100 Aminosäuren langen Bereiches N-terminal der katalytischen Domäne zu bestimmen. Dieser

konserverte Bereich war in verschiedenen Kinasen (v-Fps, c-Src,) der Src-Familie vorhanden und beeinflusst sowohl die Substraterkennung als auch die Aktivität des Enzyms. Da diese Domäne als zweites Modul innerhalb der Src-Kinasen identifiziert wurde, klassifizierte man sie als SH2-Domäne [126]. Proteine mit SH2-Domänen sind in vielen Eukaryonten vertreten. Das menschliche Genom kodiert für etwa 116 verschiedene SH2-Domänen, exprimiert in 106 Proteinen [127]. SH2-Domänen haben vielfältige Funktionen in Adaptormolekülen (Grb2), Scaffolding-Proteinen (BLNK/SLP-65), Enzymen (Src) und Transkriptionsfaktoren (Stat).

2.3.3.1. Struktur von SH2-Domänen

SH2-Domänen bestehen aus konservierten Sekundärstrukturelementen. Die Struktur einer Peptid-komplexierten Src-SH2-Domäne ist in Abb. 5 dargestellt [128]. Das Zentrum der SH2-Domäne bildet ein sieben-strängiger antiparalleler β -Mäander. Dieser besteht aus einem vier-strängigen und einem drei-strängigen β -Faltblatt-Motiv und ist über einen β -Strang verbunden. Das vier-strängige β -Faltblatt-Motiv wird auf beiden Seiten von α -Helices flankiert. Zwischen dem α -Helix B und dem β -Strang G bildet sich die BG-Schleife, die β -Stränge E und F formieren die EF-Schleife. Die Position und relative Orientierung der α -Helices und des zentralen 4-strängigen β -Faltblatts sind konserviert, die des 3-strängigen β -Strangs und der EF- und BG-Schleife variieren in verschiedenen SH2-Domänen und sind für die Ligandenspezifität der Domäne verantwortlich [129, 130].

Der SH2-Domänen-Ligand wird entweder in gestreckter (Src, Lck, SHP-1) oder in einer β -turn-Konformation (Grb2) gebunden. Die Assoziation des *poY*-Restes erfolgt in einer *poY*-Bindungstasche und wird durch Wasserstoffbrückenbindungen zu Arg α A2, Arg β B5 und Lys β D6 des Proteins stabilisiert [132]. Der Arg β B5-Rest ist hoch konserviert innerhalb der SH2-Domänen, eine Mutation zu Lys führt zur Hemmung der Ligandenbindung [37, 131, 34]. Die Aminosäuresequenz dieser Tasche (FLVRES) dient als charakteristisches Signaturmotiv der SH2-Domänen. Die Aminosäuren carboxyterminal zu *poY* binden in eine hydrophobe Bindungstasche. Obwohl der hydrophobe Charakter der Tasche konserviert ist, unterscheiden sich die SH2-Domänen hinsichtlich der Aminosäuresequenz in diesen Positionen [130, 132]. Dies resultiert in einer hohen Spezifität gegenüber den Bindungspartnern.

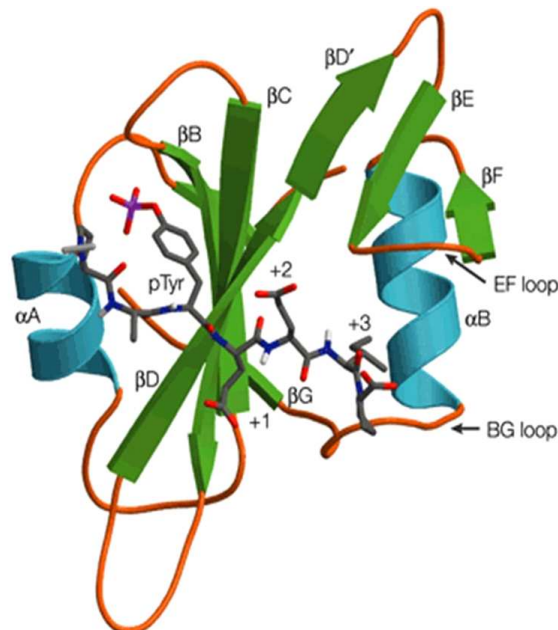


Abb. 5: Kristallstruktur der SH2-Domäne der Src-Kinase mit einem Phosphopeptidligand [130]

2.3.3.2. Klassifizierung von SH2-Domänen

Entscheidende erste Hinweise über die Selektivität einiger SH2-Domänen wurden durch ein Screening einer Phosphopeptidbibliothek mit randomisierten Positionen $poY+1$, $poY+2$ und $poY+3$ erhalten [133]. Alle SH2-Domänen der Src-Familie bevorzugten die Sequenz $poYEEI$. Durch Einpassung der Seitenketten dieses hochaffinen Src-Liganden ($poYEEI$) in die modellierte Peptid-komplezierte SH2-Domäne von Src konnten die Positionen innerhalb der SH2-Domäne identifiziert werden, die entscheidend für die Bindung des Peptids in die hydrophobe Tasche ($poY+1$ bis $poY+3$) sind. Während die Glu-Reste in $poY+1$ und $poY+2$ Kontakte mit der Oberfläche der Src-SH2-Domäne ausbilden, bindet der Ile-Rest in eine tiefe Tasche. Der am Grund dieser Tasche befindlichen Aminosäure $\beta D5$ wird die entscheidende Rolle bezüglich der Selektivität zugesprochen. Hinsichtlich ihrer Sequenz in Position $\beta D5$ wurden die SH2-Domänen daraufhin in vier Gruppen eingeteilt [133].

Beim Vergleich der Aminosäuresequenz verschiedener SH2-Domänen wurden neben der hochkonservierten poY -Bindungstasche und der hydrophoben $poY+1$ bis $poY+3$ -Bindungstasche weitere konservierte Cluster identifiziert. Die untersuchten SH2-Domänen wiesen eine Gesamthomologie von 33% auf. Entsprechend ihrer Aminosäuresequenz und dem Vorkommen spezieller Cluster wurden die SH2-Domänen nun in fünf Familien (A-E) eingeteilt (Tab. 1). Die Gruppe A' enthält die größten zusammenhängenden konservierten Bereiche. Die meisten homologen Bereiche außerhalb der Peptidbindungsstelle enthalten die Familien C und E [134].

Weitere Screenings von Phosphopeptidbibliotheken bestätigten, dass neben den Positionen $poY+1$ bis $poY+3$ die Positionen $poY+4$ bis $poY+6$ im Peptidliganden die Selektivität der Bindung beeinflussen [135, 136].

Tab. 1: Klassifikation der SH2-Domänen nach Campbell und Jackson [134].

Gruppe A		Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D	Gruppe E
Gruppe A	Gruppe A'				
Nck1/2	Lyn	Zap70	N-SH2 / C-SH2 SHP-1	N-SH2 / C-SH2 p85	N-SH2 / C-SH2 PLC γ 1
Abl	Lck	Syk	N-SH2 SHP-2		N-SH2 / C-SH2 PLC γ 2
	Src	Csk	C-SH2 SHP-2		
	Fyn		Csw		
	Blk				
	Yes				

2.3.3.3. Spezifitäten der SH2-Domänen von SHP-1 und SHP-2

Die SH2-Domänen beider Proteine zeigen eine hohe Sequenzhomologie [134] und bevorzugen hydrophobe Aminosäuren in den Positionen $poY+1$ und $poY+3$ ($poY\Phi x\Phi^2$) [133, 137]. Das Bindungsmotiv der ITIM-haltigen Rezeptoren, V/L/IxYxxL/V-Motiv, ließ vermuten, dass auch die Aminosäuren aminoterminal von poY bedeutend für die Assoziation und Aktivierung der SH2-Domänen-haltigen SHP-1 sind. Burshtyn et al. [138] zeigten, dass die C-SH2-Domäne von SHP-1 eine hohe Selektivität für hydrophobe Aminosäuren in $poY-2$ zeigt und dass diese Position entscheidend für den Aktivierungsprozess ist. Diese Spezifität wurde auch für N-SH2 von SHP-1 beschrieben [135]. Beide SH2-Domänen der homologen SHP-2 binden ebenfalls spezifisch Aminosäuren in $poY-2$ [16]. Der Grund für diese Selektivität ist die Aminosäure in $\alpha A2$ des Proteins. Die SH2-Domänen von SHP-2 und SHP-1 enthalten anstelle eines in anderen SH2-Domänen konservierten Arg ein Gly. Dadurch entsteht eine Tasche, die mit der Aminosäure in $poY-2$ interagiert [16].

Mittels Screenings einer kombinatorischen Phosphopeptidbibliothek mit fünf randomisierten Positionen ($xxpoYxxx$) konnten die Konsensussequenzen der SH2-Domänen von SHP-1 und SHP-2 ermittelt werden. Die N-SH2-Domäne bindet zwei Klassen von Peptiden (Tab. 2). Die Testung einzelner Peptide beider Klassen ergab, dass sie trotz unterschiedlichem Bindungsverhalten eine ähnliche Affinität gegenüber der N-SH2-Domäne haben und die Phosphatase aktivieren [136]. Die C-SH2-Domäne bindet selektiv Liganden mit der Sequenz

² Darstellung der Sequenzmotive nach der Seefeld-Nomenklatur [139]

(T/V/I) $xpoY$ (C/A/T) x (L/M/V) [141]. In einem früheren Screening wurde auch eine Präferenz für eine zweite Klasse an Liganden festgestellt [135]. Ein Vergleich der Konsensussequenzen beider SH2-Domänen verdeutlicht, dass neben spezifischen Bindungspartnern auch gemeinsame Interaktionspartner existieren können. Die N-SH2-Domäne von SHP-2 bindet Liganden weniger spezifisch. Es wurden vier verschiedene Konsensussequenzen ermittelt. Die optimale Bindungssequenz der C-SH2-Domäne von SHP-2 enthält ähnliche Motive wie die der C-SH2-Domäne von SHP-1 (Tab. 2).

Die SH2-Domänen beider Phosphatasen binden Liganden auch selektiv in den Positionen $poY+4$ bis $poY+6$. Im Gegensatz zu den Selektivitäten in $poY+1$ und $poY+3$ ist die Präferenz in $poY+4$ bis $poY+6$ weniger spezifisch für einzelne, sondern eher für Gruppen von Aminosäuren. Die N-SH2- und C-SH2-Domäne von SHP-1 bevorzugen hydrophobe aromatische oder positiv geladene Aminosäuren in $poY+4$ und $poY+5$. Für die N-SH2-Domäne von SHP-2 wurde eine Präferenz für hydrophobe aromatische Aminosäuren in $poY+4$ und $poY+5$ und für kleine Aminosäuren wie Pro, Gly, Ala in $poY+6$ gefunden. Die C-SH2-Domäne von SHP-2 wies eine vergleichbare Selektivität wie die C-SH2-Domäne von SHP-1 auf. Diese Spezifitäten beruhen auf extensiven Interaktionen besonders zwischen der Aminosäure in $poY+4$ und der Oberfläche der SH2-Domäne [136]. Beide Phosphatasen zeigen also sowohl vergleichbare als auch unterschiedliche Selektivitäten.

Kürzlich wurde gezeigt, dass die N-SH2-Domäne von SHP-2 auch spezifisch an Peptide mit der Sequenz (H/F) xVx (T/S/A) poY binden kann. Die Bindung der N-SH2-Domäne von SHP-1 sowie der C-SH2-Domänen beider Phosphatasen an Peptidliganden ohne Aminosäuren in $poY+1$ bis $+3$ ist dagegen gering affin [141].

Tab.2: Konsensussequenzen der SH2-Domänen von SHP-1 und SHP-2 [135, 140]

SHP 1:	Klasse	N-SH2-Domäne	C-SH2-Domäne
	I	L $xpoY$ (M/F) x (F/M) ^[a]	(T/V/I) $xpoY$ (C/A/T) x (L/M/V) ^[b] (V/I/L) $xpoY$ A X (L/V) ^[a]
	II	L $xpoY$ A xL ^[a]	$xxpoY$ (Y/F) M (K/R) ^[a]
SHP 2:	Klasse	N-SH2-Domäne	C-SH2-Domäne
	I	I/L/V/M $xpoY$ (T/V/A) x (I/V/L/F) ^[b]	(T/V/I/Y) $xpoY$ (A/S/T/V) x (I/V/L) ^[b]
	II	W (M/T/V) poY (Y/R)(I/L) x ^[b]	
	III	(I/V) $xpoY$ (L/M/T) Y (A/P/T/S/G) ^[b]	
	IV	I/V/L $xpoY$ (F/M) x (P) ^[b]	

^[a] [135], ^[b] [140].

Ein Vergleich der Konsensussequenzen mit der Sequenz bekannter natürlicher Interaktionspartner ergab, dass die ermittelten Präferenzen weitestgehend übereinstimmen (Tab. 3).

Tab. 3: Ausgewählte Interaktionspartner der SH2-Domänen von SHP-1

Interaktionspartner	Bindungssequenz	Interaktionsdomäne	Referenz
IL2-Rezeptor β	QVpoY ³⁵⁵ FTYDPY	N-SH2	[33]
IL3-Rezeptor β	LepoY ⁶²⁸ LCLPAG	N-SH2	[142]
p58 (KIR)	VtpoY ²⁸² AQLNHS	C-SH2 und evt. N-SH2	[97]
	IvpoY ³¹² TELPNA		[98]
CD22	ISpoY ⁷⁶² TTLRFP	N-SH2 und evt. C-SH2	[143]
	IHpoY ⁸²¹ SELIQF		[144]
	VDpoY ⁸⁴² VILKH		[138]
			[81]
CD72	ITpoY ⁷ ADLRFV	N-SH2 und C-SH2	[86]
	ITpoY ³⁹ ENVQVP		
CD94/NKG2-A	VIpoY ⁸ SDLNLP	N-SH2 und C-SH2	[98]
	ITpoY ⁴⁰ AELNLQ		[99]
EGFR	AEpoY ¹¹⁷³ LRVAPQ	N-SH2	[100]
Ros	LNpY ²²⁶⁷ MVLATK	N-SH2 und evt. C-SH2	[101]
	LNpoY ²³²⁷ ACLAHS		
Epo-R	LKpoY ⁴²⁹ LYLVVS	N-SH2	[33]
c-Kit	YVpoY ⁵⁶⁹ IDPTQK	N-SH2 und evt. C-SH2	[145]
			[62]
PECAM-1	VQpoY ⁶⁶³ TEVQVx TVpoY ⁶⁸⁶ SEVRKx	N-SH2 und C-SH2	[146]
			[147]
			[96]

2.3.3.4. Entwicklung von SH2-Domänen-Effektoren

SH2-Domänen-haltige Proteine sind in viele Signaltransduktionswege involviert. Fehlfunktionen in der poY-Liganden-Bindung wurden klar mit verschiedenen pathologischen Veränderungen assoziiert. So führen Mutationen innerhalb der SH2-Domäne zu Krankheiten wie z.B. Noonan-Syndrom, juveniler myelomonozytischer Leukämie (SHP-2) [148, 149] und Duncan-Syndrom (SAP) [150]. SH2-Domänen stellen deshalb ein vielfältig untersuchtes Target dar. Die Entwicklung von spezifischen Enzymmodulatoren, besonders Inhibitoren, könnte einerseits von therapeutischem Nutzen sein und dient andererseits der besseren Charakterisierung von bisher unvollständig aufgeklärten Signaltransduktionswegen.

Wichtige Informationen für die Entwicklung von SH2-Domänen-Inhibitoren lieferte das Screening kombinatorischer Peptidbibliotheken.

Die größten Fortschritte sind bisher in der Entwicklung von Grb2- und Src-Inhibitoren zu verzeichnen. In der Entwicklung von spezifischen Inhibitoren können verschiedene Ansätze unterschieden werden, die nachfolgend am Beispiel der Src- und Grb2-SH2-Domänen exemplarisch erläutert werden.

1. *Substitution spezifischer Aminosäuren durch nichtproteinogene Aminosäuren*

Nichtproteinogene Aminosäuren sind abbaustabile Analoga proteinogener Aminosäuren. Durch zusätzliche Seitenketten können weitere Kontakte mit der SH2-Domäne ausgebildet und die Peptidkonformation stabilisiert werden. Einer Gruppe von Novartis ist es gelungen, die Aminosäuren im Grb2-Ligand Ac-*po*YIN-NH₂ schrittweise durch nichtproteinogene Aminosäuren zu substituieren. Der synthetische Ligand CGP78850 hatte eine 200-fach höhere Affinität als die Leitstruktur und konnte in humanen Brustkrebszellen die Interaktion von EGFR-Grb2 und Shc-Grb2 inhibieren und die Proliferation hemmen [151-154].

2. *Herstellung von cyclischen Liganden*

Cyclische Strukturen bieten die Möglichkeit durch ein in seiner Flexibilität eingeschränktes stabileres Peptidrückgrat, die Seitenketten der Aminosäuren so zu positionieren, dass intensivere Kontakte mit der SH2-Domäne möglich sind. Die Arbeitsgruppe um Roller entwickelte Thioether-verbrückte cyclische *po*Y-freie Sequenzen, die dieselbe Konformation wie natürliche Grb2-Liganden einnehmen, jedoch eine größere Interaktionsfläche nutzen [155-157].

3. *Einführung von poY-Mimetika*

Die größte Herausforderung in der Synthese von SH2-Domänen-Inhibitoren besteht darin, die stark geladene Phosphatgruppe zu ersetzen, um neben hochaffinen auch Zell-penetrierende Liganden zu entwickeln. Als geeignete Substituenten erwiesen sich in Grb2-Liganden Phosphonomethylphenylalanin (Pmp) [158] und p-Malonylphenylalanin (Pmf) [159]. Für die Src-SH2-Domäne wurden als Mimetika 4'-Diphosphonomethyl-phenylalanin (dpmf) und 3',4'-Diphosphonophenylalanin (Dpp) vorgeschlagen [161]. Obwohl die letzten beiden Strukturen stark negativ geladen sind, waren sie in der Lage, die Zellmembran zu passieren.

4. *Herstellung von Peptidomimetika*

Die Src-SH2-Domäne bindet spezifisch Liganden an *po*Y und *po*Y+3. Die Einführung von verschiedenen Alkylamidderivaten, Ureidogruppen- und Caprolactam-enthaltenden Mimetika in die Position *po*Y+1 bis *po*Y+2 erlaubt eine stärkere Interaktion mit der SH2-Domänen-

Oberfläche [161-163]. In *poY+3* führt die Substitution des Ile-Restes durch Homozyklohexylalanin (Hcy) zur idealen Ausnutzung der *poY+3* Bindungstasche [164].

2.3.3.5. SH2-Domänen Effektoren der Enzymaktivität von SHP-1 und SHP-2

Für die SH2-Domänen von SHP-1 liegen bisher keine Strukturen vor, die eine vollständige Inhibierung der Phosphataseaktivität auslösen. Die von Park et al. [165] vorgestellten Peptidylzimtaldehyde aktivierten bis 150 μM die Phosphatase und konnten nur in höheren Konzentrationen SHP-1 inhibieren. Es wird vermutet, dass die Aldehydgruppe des Liganden zuerst eine Schiffische Base mit dem Arg-Rest der N-SH2-Domäne bildet. SPR-basierte Bindungsstudien zeigten, dass die Interaktion einer langsamen Kinetik folgt. Die Zimtaldehyde können kompetitiv einen peptidischen SH2-Domänen-Liganden verdrängen. Die Hemmung der PTP-Aktivität erfolgt durch anschließende Bindung des Liganden in der PTP-Domäne, wo ebenfalls ein konserviertes Arg zur Schiff-Base-Reaktion vorliegt [165].

In einer anderen Arbeit wurde gezeigt, dass die SHP-2-Aktivierung trotz Bindung eines phosphorylierten Liganden gehemmt werden kann. In dieser Studie wurde in NIH-3T3-Zellen (murine Fibroblasten) ein phosphoryliertes PZR-GST-Fusionsprotein eingebracht. Die Bindung der im Protein enthaltenen pITIM-Sequenzen an die SH2-Domänen von SHP-2 blockierte spezifisch die durch Wachstumsfaktoren vermittelte ERK1/2-Aktivierung. Möglicherweise ist die fehlende Translokation der aktivierten Phosphatase für die Hemmung verantwortlich [166].

Um spezifische Strukturen zu entwickeln, die eine vollständige Inhibierung auslösen, müssen die SH2-Domänen von SHP-1 und SHP-2 weiter charakterisiert werden. Es fehlen strukturelle Informationen, die zeigen, welche Assoziationen in den SH2-Domänen für die Konformationsänderung und somit Aktivierung der Phosphatase verantwortlich sind. Dieses Wissen ist notwendig, um darauf aufbauend Liganden zu entwickeln, die zu einer Blockierung der SH2-Domänen-Bindungsstelle für natürliche Liganden führen und die Enzymaktivität spezifisch beeinflussen. Wichtig ist dabei auch, die Liganden bezüglich ihrer Selektivität für SHP-1 und SHP-2 zu untersuchen. Ein verbessertes Verständnis der Wirkung Phosphotyrosin-haltiger Liganden auf den Aktivierungsmechanismus von SHP-1 und SHP-2 soll dazu dienen, eine gezielte Wirkstoffentwicklung zu ermöglichen.

3. Zielstellung

In der vorliegenden Arbeit sollte mit Hilfe von Phosphotyrosin-haltigen Peptiden der über die N-terminale SH2-Domäne ausgelöste Mechanismus der Aktivierung der Proteintyrosinphosphatase SHP-1 detaillierter charakterisiert werden. Die ausgewählten Phosphopeptide stellen eine Kombination der in der Literatur beschriebenen Konsensussequenz Klasse I für die N-SH2-Domäne und der Sequenz um Y²²⁶⁷ des hochaffinen natürlichen Interaktionspartners Ros, einer epithelialen Rezeptortyrosinkinase, dar. Neben linearen Peptiden sollten auch konformationsstabilisierte Peptide durch den Einbau von nichtproteinogenen Aminosäuren und durch Cyclisierung gewonnen werden. Im Ergebnis ihrer biologischen Testung sollten somit detaillierte Kenntnisse über konformationelle und strukturelle Anforderungen der SHP-1 SH2-Domänen, insbesondere der N-SH2-Domäne, gewonnen werden. Diese Erkenntnisse bilden die Grundlage für die perspektivisch angestrebte Entwicklung von hochaffinen und selektiven Effektoren der SHP-1-Enzymaktivität. Im Hinblick auf die synthetisierten minimal aktiven Peptidsequenzen war es von besonderem Interesse, Positionen innerhalb der Liganden zu identifizieren, die nach Assoziation mit der N-SH2-Domäne die Konformationsänderung innerhalb der Domäne und damit die Aktivierung der Phosphatase initiieren. Mit Hilfe eines *in vitro* Aktivitätstests unter Verwendung von *p*-Nitrophenylphosphat als Substrat für die katalytische Domäne, sollte die Fähigkeit der Peptide, die SHP-1-Aktivität zu stimulieren, überprüft werden. Die Bindungsaffinität der Liganden für die N-SH2-Domäne sollte mit den Methoden der Oberflächen-Plasmonresonanz-Spektroskopie und der Fluoreszenz-Anisotropie bestimmt werden. Zusätzlich zu den Informationen, die für die Aktivierung über die N-SH2-Domäne erwartet wurden, sollte die bisher noch unzureichend aufgeklärte Funktion der C-SH2-Domäne untersucht werden. Die synthetischen Peptide sollten deshalb auch im Hinblick auf deren Bindungsverhalten gegenüber der C-SH2-Domäne und auf die Modulation der Enzymaktivität verschiedener, in den SH2-Domänen mutierter SHP-1-Konstrukte analysiert werden.

Die Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 weisen trotz einer hohen Sequenz- und Strukturhomologie unterschiedliche biologische Funktionen auf. Um die Selektivität der synthetischen Liganden zu überprüfen und um die für SHP-1 aus den oben genannten Untersuchungen abgeleiteten Erkenntnisse auf deren Abgrenzung bzw. Übertragbarkeit auf SHP-2 zu analysieren, sollen außerdem *in vitro* Pulldown-Assays mit beiden Phosphatasen angeschlossen werden.

4. Materialien und Methoden

4.1. Materialien

4.1.1. Chemikalien, Lösungen und Puffer

Alle nicht einzeln aufgelisteten Standardchemikalien wurden von den Firmen Roth und AppliChem bezogen. Die Chemikalien wurden mit dem Reinheitsgrad „zur Analyse“ (p.A.) verwendet. Alle Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt und gegebenenfalls autoklaviert (20 min, 121 °C, 1 bar Überdruck).

Peptidsynthese

Die Lösungsmittel Dichlormethan, Diethylether, Methanol und Tetrahydrofuran wurden nach allgemein üblichen Methoden getrocknet und frisch destilliert eingesetzt. N,N-Dimethylformamid wurde nach Vortrocknung über Molsieb A4 und anschließender Destillation über Phtahlsäureanhydrid verwendet.

Reagenzien zur Synthese, Kopplung und Abspaltung

Chemikalien	Firma
DIEA	Fluka
Diethylether	Acros
DMF, DCM	Mineralöle Albert
HBTU	Novabiochem
HOBt	Novabiochem
Piperidin	Fluka
TIPS	Fluka
TFA	Solvay
Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0)	Aldrich
(Boc) ₂ O	Fluka

Harz und Aminosäuren und -derivate

Chemikalien	Firma
Rink-Amid-MBHA-Harz	Novabiochem
Fmoc-Leu-OH	Orpegen
Fmoc-Val-OH	Orpegen
Fmoc-Ala-OH	Orpegen
Fmoc-Nle-OH	Novabiochem
Fmoc-Tyr(PO ₃ H ₂)	Novabiochem
Fmoc-Tyr [PO(OBzl)OH]	Novabiochem
Fmoc-Lys-(Alloc)OH	Orpegen
Fmoc-Asn(Trt)-OH	Orpegen
Fmoc-Asp-OBu ^t	Novabiochem
Fmoc-Gly-OH	Orpegen
Fmoc Glu(OtBu)-OH	Novabiochem

Fmoc-Hfe-OH	ACT
Fmoc-Val-OH	Orpegen
Fmoc-Phe-OH	Orpegen
Fmoc-Ado	Neosystem
Fmoc-Tyr	Novabiochem
Abu(β Ph)	Arbeitsgruppe Reißmann
Ser(β Ph)	Arbeitsgruppe Reißmann
(+)Biotin	Fluka
5-Carboxy-fluorescein	Fluka
Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoktansäure	Neosystem

Proteinexpression und Aufreinigung

Chemikalien	Firma
Ampicillin	AppliChem
Aprotinin	Roth
Chloramphenicol	Roth
Dansyl-Glu-Gly-Arg-chlormethylketon	Calbiochem
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem
DNase I	AppliChem
Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tertaessigsäure (EGTA)	Roth
Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)	AppliChem
Faktor Xa	New England Biolabs
Gluthathione-Sepharose 4B	GE Healthcare
Glutathion-Sepharose High Performance	GE Healthcare
Glutathion reduziert (GSH)	Sigma
Isopropylthiogalaktosid (IPTG)	AppliChem
Luria Broth (LB)-Medium	AppliChem
Lysozym	Roth
Pefabloc	Roth
Pepstatin	AppliChem
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Streptavidin-Agarose	Invitrogen

SDS-PAGE und Western Blot

Chemikalien	Firma
PageRuler™ Protein Ladder	Fermentas
Prestained Protein Marker	New England Biolabs
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma
Magermilchpulver	Heirler
Super Signal ® West Pico Rabbit IgG Detection Kit (ECL-Lösung)	Pierce

Zellkulturkomponenten

Chemikalien	Firma
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH
Trypsin	PAA Laboratories GmbH
PBS (phosphate buffered saline)	PAA Laboratories GmbH

Polyethylenimin (PEI)	PAA Laboratories GmbH
Antibiotika (Penicillin/Streptomycin)	PAA Laboratories GmbH
<i>Puffer</i>	
<i>Transformation von E.coli :</i>	
KCM-Puffer (5x):	0,5 M KCl 0,15 M CaCl ₂ 0,25 M MgCl ₂
<i>Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen:</i>	
Lysispuffer (PBS):	
pH 7,3 eingestellt	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ 10 mM DTT
+ Proteaseinhibitoren	2 µg/ml Aprotinin 1 µg/ml Pepstatin 100 µg/ml Pefabloc 1 mM PMSF
Elutionspuffer I:	50 mM Tris
pH 8,0 eingestellt	100 mM NaCl 10 mM DTT
Elutionspuffer II:	50 mM Tris
pH 8,0 eingestellt	100 mM NaCl 10 mM DTT 20 mM GSH
Puffer zur Spaltung mit Faktor Xa:	
pH 8,0 eingestellt	50 mM Tris 100 mM NaCl 2 mM CaCl ₂
<i>Puffer für die Zellkultur:</i>	
Wachstumsmedium für 293-T Zellen:	DMEM 10% FCS 1% Antibiotika
Lysis-Puffer:	50 mM Tris
pH 7,5 eingestellt	150 mM NaCl 0,5% Triton X-100
+ Proteaseinhibitoren	2 µg/ml Aprotinin 1 µg/ml Pepstatin 100 µg/ml Pefabloc 1 mM PMSF 5 mM EDTA 5 mM EGTA 10 mg/ml Leupeptin 1 mM Na ₃ VO ₄
<i>SDS-PAGE und Western Blot:</i>	
6 x SDS-Probenpuffer	3 ml 20% SDS 3 ml β-Mercaptoethanol

	4 ml Glycerol
Trenngelpuffer (TGP)	2 M Tris-HCL (pH 8,8)
Obergelpuffer (OGP)	0,5 M Tris-HCL (pH 6,8)
Laufpuffer (1 l)	3,03 g Tris 15,4 g Glycin 5 ml 20% SDS
Transferpuffer	800 ml Laufpuffer 200 ml Ethanol
PBS-T	140 mM NCl 2,5 mM KCL 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 0,05% Tween 20

Biologische Assays:

Aktivierungs-Assay-Puffer: pH 7,4 eingestellt	100 mM Hepes 150 mM NaCl 1 mM EDTA 20 mM DTT
Biacore-Laufpuffer: pH 7,4 eingestellt	10 mM Hepes 150 mM NaCl 3,4 mM EDTA 0,005% Tween 20
Biacore-Regenerationspuffer: pH 7,4 eingestellt	10 mM Hepes 150 mM NaCl 3,4 mM EDTA 0,005% Tween 20 0,1% SDS
Fluoreszenz-Anisotropie-Puffer (FA)-Puffer: pH 7,4 eingestellt	20 mM Hepes pH 7,4 100 mM NaCl 2 mM DTT

4.1.2. Zelllinien und Bakterienstämme (*E.coli*)

293T	Nierenzelllinie, aus primären embryonalem Nierengewebe etabliert [167]
XL1-Blue	zur Amplifikation von bakteriellen Plasmiden (Stratagene)
BL21(DE3)pLysS	zur Expression rekombinanter GST-Fusionsproteine (Stratagene)

4.1.3. Antikörper

anti-SH-PTP1 (C-19):	sc-287 polyklonaler Antikörper (Kaninchen) gegen ein C-terminales Peptid (Santa Cruz Biotechnology), 1:4000, 2% Trockenmilch in PBS-T
anti-SH-PTP2 (N-16):	sc-424 polyklonaler Antikörper (Kaninchen) gegen ein N-terminales Peptid innerhalb der N-SH2 Domäne (Santa Cruz Biotechnology), 1:1000, 2% Trockenmilch in PBS-T

anti-Actin:	A2066/A5060 polyklonaler Antikörper (Kaninchen) gerichtet gegen ein C-terminales Peptid (Sigma), 1:5000, 2% Trockenmilch in PBS-T
anti-Kaninchen-IgG-HRP:	sc-2001 Sekundärintikörper isoliert von Ziege immunisiert mit Kaninchen gekoppelt mit Meerettich-Peroxidase (HRP) (Santa Cruz Biotechnology), 1:15 000, 1% BSA, 2% Trockenmilch in PBS-T

4.1.4. Plasmide

Die Plasmide wurden von der AG Molekulare Zellbiologie (Klinikum der FSU Jena) zur Verfügung gestellt.

pGEX-5X-1-SHP-1	<i>E.coli</i> Expressionsvektor zur Herstellung von GST-SHP-1 (epitheliale Isoform)
pGEX-5X-1-SHP-1 R38K	<i>E.coli</i> Expressionsvektor zur Herstellung von GST-SHP-1 (RK-Punktmutante)
pGEX-5X-1-SHP-1 R132K	<i>E.coli</i> Expressionsvektor zur Herstellung von GST-SHP-1 (RK-Punktmutante)
pGEX-5X-1-SHP-1 R38,132K	<i>E.coli</i> Expressionsvektor zur Herstellung von GST-SHP-1 (RK-Doppeltmutante)
pGEX-5X-1-SH2-N	<i>E.coli</i> Expressionsvektor zur Herstellung von GST-N-SH2 (SHP-1) (Aminosäuren 1-104)
pGEX-5X-1-SH2-C	<i>E.coli</i> Expressionsvektor zur Herstellung von GST-C-SH2 (SHP-1)(Aminosäuren 109-298)
prk5 SHP-1	eukaryotischer Expressionsvektor mit cDNA der epithelialen Isoform von SHP-1
prk5 SHP-2	eukaryotischer Expressionsvektor mit cDNA von SHP-2

4.1.5. Sonstiges

Poly-Prep Säulen	Bio-Rad
Spectra/Por® Float-A-Lyzer®	Roth
Polypropylenspritzen mit Fritten	Abimed
Zentrifugationsfiltereinheiten, Amicon Ultra-15	Millipore
96-Lochplatten	Greiner Bio-one
PVDF-Membran	Millipore
Blotkammer	BioRad
Röntgenfilme (Super RX)	Fujifilm
SA-Sensor-Chip	Biacore AB

4.2. Methoden

4.2.1. Festphasenpeptidsynthese

4.2.1.1. Darstellung der linearen Peptide

Die Peptide wurden manuell nach der Fmoc-Strategie an einem polymeren Träger synthetisiert. Es wurde 200 mg Rink-Amid-MBHA-Harz mit einer Beladung von 0,64 mmol/g in Polypropylenspritzen mit Fritten gegeben. Als Seitkettenschutzgruppen wurde

Trityl- (Asn) und tert.-Butylgruppen (Glu) verwendet. Nach dem Quellen des Harzes (20 min in DMF) wurde eine Lösung aus zu koppelnder Aminosäure (4 equiv.), HBTU (4 equiv.) und HOBt (4 equiv.) sowie DIEA (8 equiv.) zugesetzt. Aus Kostengründen wurde bei der Kopplung von Fmoc-Tyr(PO₃H₂) mit 2-fachem Überschuss an Aminosäure, HBTU und HOBt gearbeitet. Die Base wurde im 6-fachen Überschuss zugegeben. Die Kopplungszeit betrug 1 h. Zur vollständigen Umsetzung wurde die Kopplung wiederholt. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgt mit einer 20% Piperidin/DMF Lösung (1. 5 min, 2. 15 min). Die Menge des Dibenzofulven-Piperidin-Adduktes wurde spektralphotometrisch bei 301 nm bestimmt und ermöglichte die Berechnung die Kopplungsausbeute. Nach jedem Syntheseschritt wurde das Harz intensiv mit DMF (7 x, je 1ml) und DCM (3 x, je 1ml) gewaschen. Nach Kopplung der letzten Aminosäure wurde das Harz geteilt, um die Peptide jeweils in der N-terminal freien und der biotinylierten Form zu erhalten.

N-terminal unmodifizierte Peptide

Im Falle der freien Peptide wurde im Anschluss an die Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe das Harz wie folgt gewaschen: 5 x DMF, 3 x DCM je 1 ml und getrocknet.

N-terminal biotinylierte Peptide

Die Herstellung von biotinylierten Sequenzen beinhaltet die Kopplung von Fmoc-Ado an die Peptidsequenz und von Biotin im N-Terminus. Zur Kopplung von Biotin wurde PyBop (4 equiv.) und DIEA verwendet (8 equiv.). Die Kopplungszeit betrug 2 h.

N-terminal Fluoreszenz-markiertes Peptid

Zur Herstellung von 5-Carboxy-fluorescein markiertem Peptid wurde 5-Carboxy-fluorescein im 2 fachen Überschuss mit PyBop (2 equiv.) und DIEA (3 equiv.) versetzt und zum Harz gegeben. Die Kopplungszeit betrug 1 h. Zur vollständigen Umsetzung wurde die Kopplung wiederholt.

Für die Ablösung der Peptidsequenz vom Harz wurde TIPS (2,5%), Wasser (2,5%) sowie TFA (95%) zum trockenen Harz gegeben und der Ansatz 3 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Dabei wurden auch die Seitenkettenschutzgruppen entfernt. Anschließend wurde die Lösung filtriert und das Harz mehrfach mit 95% TFA/Wasser gewaschen. Nach Fällung in Diethylether wurde das Peptid abzentrifugiert, mehrfach mit Diethylether gewaschen und in 80% tert.-Butanol lyophilisiert. Die Ausbeute der Peptide betrug zwischen 38%-50% Rohprodukt und 5%-18% gereinigtes Peptid.

4.2.1.2. Darstellung der cyclischen Peptide

Die Synthese der linearen Peptidsequenzen erfolgte wie im Abschnitt 4.2.1.1. beschrieben. Um die Bildung von Fehlsequenzen zu unterbinden, wurden nicht umgesetzte Aminogruppen nach Kopplung der ersten Aminosäure blockiert (1 equiv. Acetanhydrid, 2 equiv. N-Methylimidazol, 3 equiv. DMF, 30 min). Als orthogonale Schutzgruppe wurde der Alloc/OAll-Typ gewählt. Die Herstellung von Fmoc-Asp(Gly-OAll)OH erfolgte nach Imhof et al. [175]. Zur Kopplung des Dipeptidblocks wurde PyBop (2 equiv.), HOBt (2 equiv.) und DIEA (4 equiv.) verwendet. Der Phosphotyrosinbaustein wurde monobenzylgeschützt eingesetzt (Fmoc-Tyr [PO(OBzl)-OH]) und in 2 fachem Überschuss mit HBTU (2 equiv.), HOBt (2 equiv.) und DIEA (6 equiv.) an die wachsende Peptidkette gekoppelt. Zur Herstellung der N-terminal freien und biotinylierten Peptide wurde das Harz nach Kopplung der letzten Aminosäure geteilt.

N-terminal unmodifizierte Peptide

Im Falle der freien Peptide wurde die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe durch die Boc-Schutzgruppe ersetzt [175]. Dazu wurde (Boc)₂O (5 equiv.) nach Aktivierung mit DIEA (10 equiv.) in DMF ankondensiert.

N-terminal biotinylierte Peptide

Nach Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe wurde analog 4.2.1.1. Fmoc-Ado und Biotin gekoppelt.

Die Alloc/OAll Abspaltung wurde in einer Mischung aus DMF, THF, 0,5 N HCl, Morpholin (1:1:10,5:0,45) und einer Spatelspitze Pd⁰(PPh₃)₄ als Katalysator realisiert [184]. Die Cyclisierung erfolgte mittels PyBop (6 equiv.) und DIEA (12 equiv.). Die Kopplungsdauer betrug 3 h. Die Ablösung der Peptide vom Harz wurde analog 4.2.1.1. durchgeführt.

Die Ausbeute betrug im Mittel 85%-96% Rohprodukt und 8%-12% gereinigtes Peptid.

4.2.2. Chemische Charakterisierung der Peptide

4.2.2.1. Semipräparative HPLC

Die Rohprodukte der Peptide wurden an einer LC-8A-Anlage (Shimadzu), ausgestattet mit einer Eurospher 100-Säule (Firma Knauer, C18, 250 x 32,5 µm Korngröße, 100 Å Porengröße) getrennt.

Für die Trennung wurden folgende Bedingungen ausgewählt. Die Fraktionen wurden manuell gesammelt und lyophilisiert.

Eluent A:	0,1% TFA in Wasser
Eluent B:	0,1% TFA in 90% Acetonitril/Wasser
Fussrate:	10 ml/min
Detektion:	220 nm
Gradient :	15% - 65% Eluent B in 120 min

4.2.2.2. Analytische HPLC

Die Analyse der Peptide erfolgte an einer LC-10AT-Anlage (Shimadzu), welche mit einer Vydac 218TP-Säule (25 x 4,6 mm, 300 Å Porengröße, 5 µm Korngröße) ausgestattet war.

Für die Charakterisierung der Peptide wurden verschiedene Gradienten gewählt.

Eluent A:	0,1% TFA in Wasser
Eluent B:	0,1% TFA in Acetonitril
Fussrate:	1 ml/min
Detektion:	220 nm
Gradient 1:	10% - 50% Eluent B in 40 min
Gradient 2:	10% - 60% Eluent B in 50 min

4.2.2.3. Massenspektrometrie

Die Peptide wurden mit einem Laser-Tec Research Massenspektrometer (Perspective Biosystems) als Flugzeitspektren (MALDI-TOF) analysiert. Als Matrix diente α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure. Als Lösungsmittel wurde 0,1% TFA in Acetonitril/Wasser (1:1) verwendet.

4.2.2.4. Dünnschichtchromatographie

Für diese Untersuchungen wurden mit Kieselgel 60 F 254 beschichtete Glassplatten (Merck) eingesetzt. Als Laufmittelsysteme wurden n-Butanol/Eisessig/Wasser (48:18:24) und Pyridin/Essigester/Eisessig/Wasser (5:5:1:3) verwendet.

4.2.2.5. Aminosäureanalyse

Eine definierte Menge Peptid wurde mit 6 N HCL versetzt und 24 Stunden bei 110 °C im Heizblock hydrolysiert. Die Zusammensetzung des Peptides wurde mittels Aminosäureanalysator LC 3000 (Eppendorf-Biotronik) analysiert. Die Detektion erfolgte mit Ninhydrin bei 570 nm und bei 440 nm. Die Konzentration der einzelnen Aminosäuren wurde durch Vergleich der integrierten Peakflächen mit denen eines Aminosäurestandards bestimmt.

4.2.3. Modellierung der Peptidliganden

Da die N-SH2-Domäne von SHP-1 bisher nur in der freien Form als Kristallstruktur vorliegt [13], wurde für das Docking die N-SH2-Domäne der strukturhomologen SHP-2, basierend auf der Kristallstruktur von SHP-2 (PDB1AYC) in Komplex mit dem Phosphopeptid des PDGFR⁷⁴⁰ (GGp ρ YMDMS), genutzt. Entsprechend der Sequenzunterschiede wurden die Aminosäuren V14, K35, S36, K55, K89, E90, K91 von SHP-2 gegen die Aminosäuren L14, R35, K36, R55, E89, D90, R91 von SHP-1 ausgetauscht [16]. Mit dem Molekül-Modellierungsprogramm Insight II (Accelrys) wurden nun die geplanten Phosphopeptidliganden durch Superpositionierung in die Struktur des PDGFR⁷⁴⁰ eingebaut. Nach dem Setzen der Atompotentiale erfolgte die Energieminimierung basierend auf dem cfvv-Kraftfeld des Discover-Moduls von Insight II. Es wurde das „implicit solvent“ Model und eine Dielektrizitätskonstante von 4,0 benutzt. Im ersten Teil wurde in 400 Schritten das Peptidrückgrat fixiert, während die Seitenketten der Domäne mit einer Kraftkonstante von 100 kcal/mol/Å² in ihrer Flexibilität eingeschränkt wurden. Im zweiten Teil wurden in erneut 400 Schritten die Einschränkungen aufgehoben, um die Ausbildung der günstigsten Konformation zu gewähren.

4.2.4. Rekombinante Expression und Aufreinigung von Proteinen in *E. coli*

4.2.4.1. Bakterienmedien

Alle Medien wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt (autoklaviert bei 121 °C, 20 Minuten). Dem Bakterienstamm BL21(DE3) und XL1-Blue wurde nach dem Abkühlen Ampicillin (100 µg/ml) zugesetzt, für die Überexpression von Proteinen mit dem BL21(DE3)pLysS Stamm wurde sowohl Ampicillin als auch Chloramphenicol (30 µg/ml) zugegeben. Agarplatten und Medien wurden bei 4 °C aufbewahrt.

4.2.4.2. Transformation von *E.coli*

Zur Transformation des *E.coli* Stammes BL21(DE3)pLysS mit den bakteriellen Expressionsplasmiden wurde die Plasmid-DNA (0,5-10 µl) mit 5x KCM-Puffer (20 µl), 80 µl Wasser und den kompetenten Zellen (100 µl) versetzt. Nach Inkubation bei 4 °C (30 min) wurde die Zellsuspension 10 min bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurde 1 ml LB-Medium (ohne Antibiotikum) zugegeben und der Ansatz 1 h bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. 50-100 µl der Transformationslösung wurden auf LB-Agarplatten (vorbehandelt mit Antibiotikum) aufgebracht und 16 h bei 37 °C inkubiert. Einzelne Klone wurden ausgewählt und zur Proteinexpression oder zur Herstellung von Dauerkulturen verwendet.

4.2.4.3. Herstellung von Dauerkulturen

Dauerkulturen wurden durch Mischen der Übernachtskultur mit sterilem Glycerol (Endkonzentration 30% v/v) hergestellt und bei -80 °C gelagert.

4.2.4.4. Expression von GST-Fusionsproteinen

5 ml mit Antibiotika versetztes LB-Medium wurden mit einer von der Platte ausgewählten *E.coli* Kolonie oder etwas Dauerkultur versetzt und für 16 h bei 37 °C auf dem Schüttler kultiviert. Nach Zugabe der Vorkultur zu 500 ml LB-Medium wurde die Suspension bis zum Erreichen einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,7 bei 37 °C geschüttelt. Die Expression des Zielproteins wurde durch Zugabe von IPTG (250 µM) induziert. Die Induktionsdauer betrug 4 h und wurde bei 25 °C durchgeführt. Die Bakteriensuspension wurde zentrifugiert (6000 rpm, 10 min, 4 °C) und über Nacht bei -80 °C gelagert. 1 mg Bakterienpellet wurde in 10 ml Lysepuffer (+ Proteaseinhibitoren) resuspendiert. Eine erfolgreiche Lyse der *E.coli*-Zellen konnte für *full length* SHP-1 durch Zugabe von Lysozym (0,5 mg/ml, 20 min bei Raumtemperatur) und anschließender Inkubation mit Triton-X-100 (0,5% v/v, 20 min bei Raumtemperatur) erzielt werden. Eine optimale Zelllyse der Bakterienkultur mit den Proteinen N-SH2 SHP-1 und C-SH2 SHP-1 wurde mittels 2-3 Passagen durch die French Press erreicht. Die lysierte Probe wies aufgrund freier chromosomaler DNA eine hohe Viskosität auf. Eine Klärung der Probe wurde durch Zugabe von DNase I (0,1 mg/ml und 100 mM $MgSO_4$) erreicht. Nach Zugabe von EGTA (5 mM) und EDTA (5 mM) wurden die löslichen Bestandteile der Probe von den unlöslichen durch Ultrazentrifugation getrennt (30 000 rpm, 30 min, 4 °C). Der Überstand wurde für 1 h bei 4 °C mit 1 ml Glutathion-Sepharose 4B (für *full length* SHP-1) oder 1 ml Glutathion-Sepharose High Performance (N-SH2 SHP-1,

C-SH2 SHP-1) auf dem Drehrad inkubiert. Nach Filtration durch eine Poly-Prep Säule wurde die Sepharose gewaschen (30 ml Lysispuffer, 10 ml Elutionspuffer I). Das gebundene GST-Fusionsprotein wurde durch Zugabe von Elutionspuffer II eluiert. Das Zielprotein wurde mit Glycerol versetzt (30% v/v) und bei -80 °C gelagert. Die Reinheit wurde durch SDS-Page und Coomassiefärbung überprüft.

4.2.4.5. Herstellung von GST-freiem Protein

Die Proteinlösung wurde unter dreifachem Pufferwechsel gegen den Xa-Puffer dialysiert. Die Protease Faktor Xa wurde im Verhältnis 1:200 zugegeben und der Ansatz 16 h bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Dansyl-Glu-Gly-Arg-chlormethylketon (0,1 µM) sowie den Inhibitoren Pefabloc, Pepstatin, Aprotinin und PMSF gestoppt. Freies GST wurde über eine 1 ml Glutathione-Sepharose Säule abgetrennt. Das Zielprotein wurde mit Glycerol versetzt (30% v/v) und bei -80 °C gelagert. Die Reinheit wurde durch SDS-Page und Coomassiefärbung überprüft.

4.2.4.6. Proteinreinigung mittels Gelfiltration

Die Trennung erfolgte an einer Gelfiltrationsanlage, Pharmacia LKB GP-10 (Pharmacia LKB Biotechnology AB) bestückt mit einer SephacrylTM 16/60 S-100 High Resolution Säule. Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung analysiert und mit Zentrifugationsfiltereinheiten (Amicon Ultra-15, Millipore) aufkonzentriert.

Eluent:	BIAcore-Puffer
Flussrate:	0,5 ml/min
Detektion:	280 nm

4.2.5. Expression von SHP-1 und SHP-2 in 293T-Zellen

4.2.5.1. Transfektion von 293T-Zellen

Die 293T-Zellen (kultiviert in Wachstumsmedium, 37 °C, 5% CO₂) wurden am Vortag der Transfektion trypsinisiert (Zugabe von 1 ml Trypsin) und anschließend in Wachstumsmedium verdünnt neu in 10 cm Schalen ausgesät (2 Mio Zellen/ml). Am Tag der Transfektion wurden die Zellen zuerst mit serumfreiem Medium (8 ml/Platte) überschichtet. Anschließend wurde je Platte 300 µl Transfektionsansatz (150 µl PBS + 10 µg DNA und 150 µl PBS + 27 µl 10 mM Polyethylenimin) hergestellt. Diese Lösung wurde bei Raumtemperatur (30 min) inkubiert und anschließend tropfenweise zu den Zellen gegeben. Nun wurden die Platten 4 h im

Brutschrank (37 °C) belassen. Danach erfolgte ein Mediumwechsel (Wachstumsmedium, 8 ml/Platte). Nach 48 - 72 h konnten die Zellen lysiert werden.

4.2.5.2. Lyse der 293T-Zellen

Das Wachstumsmedium wurde abgesaugt. Dann wurden die Zellen nach Zugabe von 5 ml eiskaltem PBS/Platte vorsichtig abgeschabt und in ein 50 ml Falcon überführt. Nun wurde die Zellsuspension zentrifugiert (2000 rpm, 10 min, 4 °C) und der Überstand abgesaugt. Nach Resuspension des Pellets in Lysispuffer (0,5 ml/Platte) wurde der Ansatz bei 14 000 rpm zentrifugiert (10 min, 4 °C), um die Zellkerne zu pelletieren. Die Proteinkonzentration des Überstandes wurde mittels Bradford (4.2.7.2.) bestimmt und das Lysat bei -80 °C bis zum Gebrauch gelagert.

4.2.6. Charakterisierung der Proteine mit SDS-PAGE und Immunoblot

4.2.6.1. SDS-PAGE nach Lämmli

Die Proteinproben wurden in SDS-Probenpuffer verdünnt und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Die Gele wurden in Minigelkammern (miniVE Vertical Electrophoresis Systems, Amersham Bioscience) gegossen. Von dem Trenngelansatz wurde 1 ml abgenommen und als Dichtungsgel in die Apparatur gegossen. Nun wurde das Trenngel eingefüllt und mit Isopropanol überschichtet, um eine gleichmäßige Grenzfläche zu erhalten. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Sammelgel aufgefüllt. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 20 mA/150 V (Desatron 500/400, DESAGA) in Laufpuffer. Die Gele wurden anschließend mit Coomassie gefärbt und getrocknet oder zum Immunoblotting verwendet.

Trenngel	7,5%	10%	15%
30 % Polyacrylamid	2,5 ml	3,3 ml	5,0 ml
TGP	1,9 ml	1,9 ml	1,9 ml
20% SDS	50 µl	50 µl	50 µl
H ₂ O	5,6 ml	4,8 ml	3,1 ml
20% APS	40 µl	40 µl	40 µl
TEMED	4 µl	4 µl	4 µl

Sammelgel	4,0%
30 % Polyacrylamid	0,66 ml
OGP	1,25 ml
20% SDS	25 µl
H ₂ O	3,1 ml
20% APS	30 µl
TEMED	2 µl

4.2.6.2. Western Blot und Immunfärbung

Nach Auftrennung der Proteine im SDS-Gel erfolgte der Transfer auf eine PDVF-Membran in einer Blotkammer (Mini Trans-Blot Cell, BIO-RAD) mit Transferpuffer (150 mA/Gel, 2 h).

Die Membran wurde mit PBS-T gewaschen und mindestens 1 h mit 5% Milchpulver blockiert, um unspezifische Bindungen zu minimieren. Dann erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (über Nacht, 4 °C). Anschließend wurde die Membran dreimal 10 min mit PBS-T gewaschen (10 ml) und für 1 h mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die Membran für circa 2 min mit 2 ml ECL-Lösung bedeckt und anschließend entwickelt (Gerät: Protect).

4.2.7. Konzentrationsbestimmungen

4.2.7.1. Malachitgrünassay

Für den Phosphatase-Assay wurden 2 mM Peptidlösungen in Aktivierungs-Assay-Puffer hergestellt. 50 µl der Lösungen wurden lyophilisiert und in 1 ml 6 N HCl gelöst. Nach 24-stündiger Hydrolyse bei 110 °C wurde die HCl an der Speed Vac (Savant) entfernt. Die Probe wurde nun mit Wasser (2 x mit je 1 ml) gewaschen und mit 500 µl Acetatpuffer (Laborservice Onken) versetzt.

Von einer Phosphatstandardlösung (Biomol-Green) wurden verschiedene Verdünnungen hergestellt (1600 pmol, 800 pmol, 400 pmol, 200 pmol).

Nun wurden 25 µl der hydrolysierten Peptidlösungen (1:5 verdünnt) sowie der Standardlösungen mit 100 µl Malachitgrün-Reagenz (Biomol-Green) versetzt. Nach 25 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Menge an freiem Phosphat spektralphotometrisch an einem VERSA max-Photometer (Molecular Devices Corporation) bei 620 nm bestimmt.

4.2.7.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford et al. [168] mit dem Roti-Nanoquant-Kit (Carl Roth AG) analog den Herstellerangaben.

4.2.7.3. Spektralphotometrische Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Absorption der Proteinlösung bei 280 nm wurde an einem Lambda 15 UV/VIS-Spektrophotometer (Perkin Elmer) bestimmt. Unter Einbeziehung des rechnerisch ermittelten Extinktionskoeffizienten nach Gill et al. [169] wurde die Konzentration des Proteins nach dem Lambert-Beer-Gesetz berechnet.

4.2.8. Biologische Testung

4.2.8.1. Phosphatase-Aktivitäts-Tests

Die Fähigkeit der Peptide, SHP-1 (*full lenght*) sowie die SHP-1 Mutanten R38K, R132K, R38,132K zu aktivieren, wurde mittels pNPP als Substrat bestimmt. Verschiedene Konzentrationen der Peptide (25 μ M-500 μ M) wurden, in Phosphatase-Assay-Puffer gelöst (40 μ l Ansatz) und mit SHP-1 (Endkonzentration 15 nM) und dem Substrat pNPP (10 mM) versetzt, bei 30 min bei Raumtemperatur inkubiert (Reaktionsansatz 50 μ l). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 N NaOH (100 μ l) gestoppt. Die Menge an entstandenem p-Nitrophenolat-Anion wurde an einem Spektralphotometer (VERSA max, Molecular Devices Corporation) bei 405 nm gemessen. Die Ergebnisse wurden relativ zu Ros pY²²⁶⁷ oder relativ zur Basalaktivität (ohne Peptid) angegeben.

4.2.8.2. Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (Biacore)

Die Affinität der Peptide für die N-SH2- und C-SH2-Domäne von SHP-1 wurde mit Oberflächenplasmonresonanz bestimmt. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur mit einem BIAcore 2000 Gerät (BIAcore AB) durchgeführt. Als Laufpuffer wurde ein HEPES-Puffer (BIAcore-Laufpuffer) gewählt. Die mit Streptavidin beschichteten Sensorchips (SA-chips) wurden konditioniert (10 μ l einer Lösung aus 1 M NaCl in 50 mM NaOH, Flussrate 30 μ l/min, 3 x).

Anschließend erfolgte die Immobilisierung der biotinylierten Peptide durch Aufgabe von 10 μ l einer 0,1 μ M Peptidlösung (Flussrate 10 μ l/min) bis zu einem Level von 20-40 RU. Auf jedem Sensor-Chip wurde die Flusszelle 1 als Kontrollfläche nicht beladen.

Für die Bindungsstudien wurden steigende Konzentrationen (10 nM–1000 nM) Protein über den Sensorchip geleitet (150 μ l). Um Massentransferlimitationen zu vermeiden, wurde eine Flussrate von 30 μ l/min gewählt. Nach Injektion der Proteinlösung (Assoziation) erfolgte mit Biacore-Laufpuffer (300 sec) die Dissoziation. Zwischen den Injektionen wurde die Chip-Oberfläche mit Biacore-Regenerationspuffer behandelt (10 μ l), um unvollständig dissoziiertes Protein zu entfernen.

Die Auswertung erfolgte mit der BIAevaluation Software. Kinetische Aussagen konnten mit dem *Separate fit* getroffen werden, Dissoziationskonstanten (K_D -Werte) wurden mit dem *steady state* Model erhalten.

Für kompetitive Bindungsstudien wurde eine Proteinlösung (1 μ M) mit steigenden Konzentrationen N-terminal unmodifizierter Peptide (31 nM-50 μ M) versetzt (150 μ l Ansatz)

und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Injektion über die mit *poYRos*²²⁶⁷ immobilisierte Flusszelle wurde das Bindungslevel (RU_{eq}) bestimmt. Die RU_{eq} Level wurden relativ zu dem Wert ohne kompetitives Peptid aufgetragen und die IC_{50} Werte mit Hilfe der GraphPad Prism Software (*One site competition*-Modell) berechnet.

steady state-Modell:

$$RU_{eq} = RU_{max} * [Protein] / (K_D + [Protein])$$

RU_{max} = maximal gemessene RU

RU_{eq} = RU im Gleichgewichtszustand

separate fit:

$$K_D = k_{off} / k_{on}$$

k_{off} = Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante

k_{on} = Assoziationsgeschwindigkeitskonstante

One site competition-Modell:

$$Y = B_{min} + (B_{max} - B_{min}) / (1 + 10^{(X - \text{LogEC}_{50})})$$

$X = \log[\text{Peptid}]$

Y = Bindung

B_{min} = minimal gemessene Bindung

B_{max} = maximal gemessene Bindung

4.2.8.3. Fluoreszenz-Anisotropie-Messungen

Da die Fluoreszenz-Anisotropie r eines Moleküls über die Rotations-Relaxationszeit auch von der Molekülmasse des Moleküls abhängt, eignet sich diese Methode zur Bestimmung von Bindungskonstanten.

Die Untersuchungen wurden im 96-well Format (Fluoreszenzplatten) bei Raumtemperatur an einem POLARstar Optima (BMG Labtech) durchgeführt.

Für die Sättigungsexperimente wurden steigende Konzentrationen der GST-N-SH2 Domäne von SHP-1 (15 nM–2000 nM) mit 5-Carboxy-Fluorescein-markiertem Ros *poY*²²⁶⁷ (20 nM in FA-Puffer) versetzt (50 μ l Ansatz). Die Anisotropie wurde durch Anregung bei 485 nm und Emission bei 520 nm bestimmt. Es wurden 4 Messwerte in 15 min aufgenommen und die mittlere Intensität bestimmt.

Für kompetitive Assays wurden zu 20 nM 5-Carboxy-Fluorescein-markiertem Ros *poY*²²⁶⁷ und 1 μ M GST-N-SH2 steigende Konzentrationen (70 nM–20 μ M) von N-terminal unmodifiziertem Peptid gegeben (50 μ l Ansatz). Nach 15 min Inkubationszeit wurde die Anisotropie analog der Sättigungsexperimente bestimmt.

Der K_D -Wert von Ros *poY*²²⁶⁷ sowie die IC_{50} Werte wurden mit Hilfe der GraphPad Prism Software (*One site binding*-Modell) berechnet.

One site binding-Model: $Y = B_{\max} * X / (K_D + [Protein])$
Y = Bindung
X = Proteinkonzentration
B_{max} = maximal gemessene Bindung

4.2.8.4. Pulldown-Assay

Die Lysate der 293T-Zellen wurden entsprechend einer Konzentration von 50 µg mit 5 µg biotinyliertem Peptid versetzt (200 µl Reaktionsansatz) und über Nacht auf dem Drehrad inkubiert (4° C). Die Streptavidin-Agarose wurde dreimal mit Lysispuffer gewaschen und zu dem Ansatz gegeben (je 20 µl). Nach Inkubation (1 h) auf dem Drehrad (4 °C) wurden die Beads dreimal mit Lysispuffer gewaschen und in SDS-Probenpuffer 5 min bei 95 °C gekocht. Der Überstand wurde dann mittels SDS-PAGE und Western Blotting analysiert.

5. Ergebnisse und Diskussion

5.1. Auswahl und Modellierung von Peptidliganden der N-SH2-Domäne

Erste Serie von Liganden³

Als Leitstruktur für die Entwicklung von spezifischen Enzymeffektoren von SHP-1 wurde die Sequenz des hochaffinen natürlichen Interaktionspartners Ros poY^{2267} gewählt (Tab. 4), dessen Aminosäuresequenz der Konsensussequenz-Klasse I für die N-SH2-Domäne entspricht [136].

Um die strukturellen Anforderungen der N-SH2-Domäne von SHP-1 zu charakterisieren, wurde im ersten Schritt die in dieser Konsensussequenz bevorzugten Aminosäuren in den Positionen $poY+1$ (Met, Phe), $poY+2$ (Tyr) und $poY+3$ (Phe, Met) in die Ros poY^{2267} -Sequenz eingebaut. Da das Schwefelatom im Met während der Synthese und dem Screening einer kombinatorischen Peptidbibliothek leicht zu Sulfoxiden oxidiert werden kann, wurde von Beebe et al. [136] im Austausch das isostere Norleucin (Nle) eingesetzt. Dieser Austausch wurde beibehalten (Peptide **1, 2, 9, 10, 11**).

Um spezifische Peptidliganden zu entwickeln, deren Wirkungsdauer im Organismus im Vergleich zu natürlichen Liganden verlängert ist, wurden im zweiten Schritt nichtproteinogene, abbaustabile Aminosäuren wie α -Amino- β -phenylbuttersäure (Abu(β Ph)), β -Phenylserin (Ser(β Ph)) und Homophenylalanin (Hfe), die als Phe-Substituenten bereits bei der Herstellung von Bradykinin-Analoga Verwendung fanden [170, 171, 172], für den Einbau in die Positionen $poY+1$ und $poY+3$ genutzt (Peptide **3, 4, 5, 6, 7, 8, 9**). Diese Aminosäuren können gleichzeitig die Konformation des Liganden über zusätzliche Aminosäureseitenketten stabilisieren. Aufgrund des Vorhandenseins von 2 chiralen Zentren in Abu(β Ph) und Ser(β Ph) können je vier Diastereomere vorliegen. Deren Einbau in die Peptidliganden sollte dazu dienen, die Auswirkung der Konfigurationsänderung auf die Wirksamkeit zu bewerten (Peptide **5a-5d, 6a, 6b, 7a, 7b, 8a, 8b**). 1,2,3,4,-Tetrahydroisochinolin-3-carbonsäure (Tic) ist eine sterisch eingeschränkte Aminosäure, die häufig als hydrophober Ersatz für Phe in Peptidhormonanaloga zum Einsatz kam [173] und in dieser Studie ebenfalls in die Positionen $poY+1$ und $poY+3$ eingebaut wurde, um den sterischen Anspruch der Aminosäurereste in diesen Positionen zu prüfen.

³ Ausgangspunkt der Untersuchungen war eine Serie an Liganden, die bereits in der Arbeitsgruppe synthetisiert worden war. Deren biologische Testung und alle nachfolgenden Untersuchungen sind Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

In einem dritten Ansatz wurde die Flexibilität des Peptides durch Stabilisierung des Peptidrückgrats reduziert. Die Peptidsequenz von Ros poY^{2267} wurde durch Cyclisierung konformationell fixiert. Um die Interaktionen der für die Bindung wichtigen Aminosäuren in $poY-2$, $poY+1$ und $poY+3$ nicht zu beeinträchtigen, wurden die Positionen $poY-1$ und $poY+2$ für den Ringschluss vorgeschlagen. Für die Verknüpfung wurden diese Aminosäuren durch Lys ($poY-1$) und Asp/Glu ($poY+2$) substituiert, um die Cyclisierung zwischen den Aminosäureseitenketten zu gestalten (Peptide **13**, **14**, **15**).

Vor der Synthese der Peptidliganden erfolgte eine Vorauswahl mittels theoretischem Docking⁴. Da die Kristallstruktur der Peptid-komplexierten N-SH2-Domäne von SHP-1 noch nicht vorliegt, wurde die strukturhomologe N-SH2-Domäne von SHP-2 genutzt und die in der Bindung involvierten SHP-1 spezifischen Aminosäuren ausgetauscht [174, 13]. Die geplanten Liganden wurden durch Superpositionierung mit dem Molekül-Modellierungsprogramm InsightII von Accelrys auf dem in der Kristallstruktur (PDBAYC) vorhandenen Peptid PDGF poY^{740} in der Ligandenbindungstasche eingebaut. Nach Setzen der Atompotentiale erfolgte die Energieminimierung, basierend auf dem cfv-Kraftfeld des Discover-Modules von InsightII. Dabei wurden sowohl die SH2-Domäne als auch die Peptidliganden flexibel gehalten, so dass die energetisch günstigste Konformation erreicht werden konnte. Die Differenz der Interaktionsenergie zwischen SH2-Domäne und jeweiligem Peptidligand wurde relativ zur Interaktionsenergie von der Domäne und der des Ausgangs-peptids Ros poY^{2267} gesetzt. Diese Daten sind in Tab. 4 dargestellt.

Alle linearen Phosphopeptide, basierend auf L-Aminosäuren, assoziierten in gestreckter Konformation mit der N-SH2-Domäne. Im Vergleich zu Ros poY^{2267} wurde für diese Gruppe von Peptidliganden eine niedrigere freie Bindungsenergie, gleichbedeutend mit einer höheren Affinität für die Domäne, ermittelt. Einzig Peptid **12** mit Tic in $poY+1$ und $poY+3$ ist sterisch so eingeschränkt, dass kein optimales Einpassen in die Domäne möglich war. Trotzdem wurde ein Ligand dieser Sequenz synthetisiert, um die Güte der Molecular-Modeling-Studien zu bewerten.

⁴ Dieses wurde von Dr. K Wieligmann unter Anleitung von Prof. Dr. M. Zacharias durchgeführt.

Tab. 4: Sequenz der Phosphopeptidliganden und Ranking der freien Bindungsenergie relativ zu Ros pY²²⁶⁷ (0 kcal/mol) (1. Serie) [175]

Nr.	Peptidsequenz	(kcal/mol)
pY2267	EGLNpY ^M VL	0
1	EGLNpY ^F VL	-3
2	EGLNpY ^M VF	-9
3	EGLNpY- Hfe -VL	-2
4	EGLNpY ^M V- Hfe	-6
5a	EGLNpY- L-threo-Abu(βPh) -VL	-6
5b	EGLNpY- L-erythro-Abu(βPh) -VL	-7
5c	EGLNpY- D-threo-Abu(βPh) -VL	-
5d	EGLNpY- D-erythro-Abu(βPh) -VL	-
6a	EGLNpY ^M V- L-threo/erythro-Abu(βPh)	-8/-12
6b	EGLNpY ^M V- D-threo/erythro-Abu(βPh)	-
7a	EGLNpY- L-threo-Ser(βPh) -VL	-4
7b	EGLNpY- D-threo-Ser(βPh) -VL	-
8a	EGLNpY ^M V- L-threo-Ser(βPh)	-9
8b	EGLNpY ^M V- D-threo-Ser(βPh)	-
9	EGLNpY- Nle -VL	-10
10	EGLNpY ^F VF	-12
11	EGLNpY ^M YF	-8
12	EGLNpY- Tic-I-Tic	+1.9
13	EGLKpYMDL $\begin{array}{c} \\ \text{COCH}_2\text{NH} \\ \end{array}$	-4
14	EGLKpYME L $\begin{array}{c} \\ \text{COCH}_2\text{NH} \\ \end{array}$	-2
15	EGLKpYME L $\begin{array}{c} \\ \text{---} \\ \end{array}$	+12

Eine Assoziation von Peptidliganden mit den D-Analoga von Abu(βPh) und Ser(βPh) mit der N-SH2-Domäne ist aufgrund von fehlender Interaktion mit der hydrophoben *poY*+1 bis *poY*+3 Tasche nicht möglich. Für die *erythro*- und *threo*-Formen von Abu(βPh) und Ser(βPh) wurden nur marginale Unterschiede in der freien Bindungsenergie berechnet.

Die Modellierung der cyclischen Liganden ermittelte als ideale Ringgröße für die Ausbildung der benötigten gestreckten Konformation eine Cyclisierungseinheit aus 12 bis 13 Atomen. Daher wurde in die Peptide **13** und **14** eine Verbrückungseinheit (Gly) in den Cyclus eingebaut. Um diese Hypothese zu testen, wurde im Vergleich dazu die biologische Aktivität eines Liganden ohne Verbrückungseinheit evaluiert (Peptid **15**).

Mittels Modellierung konnten auch die Stellen innerhalb der Domäne definiert werden, die mit den Phosphopeptidliganden interagieren (Abb. 6). So wurde für das konservierte Leu in Position *poY*-2 eine Assoziation mit dem Gly13 und Leu14 der Domäne festgestellt. Die positiv geladene *poY*-Tasche formierte sich aus den Aminosäuren Arg32, Lys36, His53 und Arg55. Die Aminosäuren Tyr66, Ile53 und Arg55 bilden die hydrophobe Tasche, die mit Resten in *poY*+1 und *poY*+3 des Ros pY²²⁶⁷ interagiert.

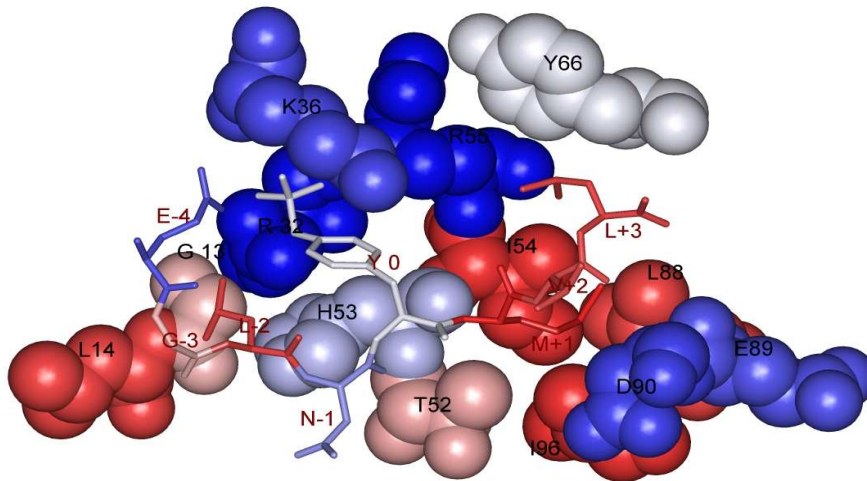


Abb. 6. Darstellung der Ligandenbindungsstellen innerhalb der N-SH2-Domäne von SHP-1 nach Komplexierung mit Ros *poY*²²⁶⁷ [176].

Die SH2-Domäne ist als Kalotten-, der Ligand als Skelettmodell dargestellt. Die Färbung der Strukturelemente ist bezogen auf deren Hydrophobizität. Blau dargestellte Bereiche sind hydrophil, rote Elemente stark hydrophob. Die Konfiguration des Dockings entspricht der Bindung im energieminierten Zustand.

Zweite Serie von Liganden

Aufbauend auf den Ergebnissen der ersten Serie wurden im zweiten Teil der Arbeit Liganden mit einer Kombination der optimalen Aminosäuren in *poY*+1 und *poY*+3 hergestellt und getestet (Tab. 5). Es wurde postuliert [176], dass ein perfektes Einpassen in die *poY*+1 und *poY*+3 Tasche entscheidend für die Aktivierung der Phosphatase über N-SH2-Domänen-gerichtete Liganden ist (Peptide **16** und **17**).

In weiteren cyclischen Peptidliganden sollte nun ermittelt werden, ob sich die Wirksamkeit durch den Einbau von optimalen Aminosäuren in *poY*+1 und *poY*+3 und Fixierung des Peptidrückgrates verändert und die resultierende Konformation des jeweiligen Peptides ein Ausfüllen der hydrophoben *poY*+1 und *poY*+3 Bindungstasche erlaubt (Peptide **18** und **19**).

Um Unterschiede im Bindungsverhalten der verschiedenen Konsensussequenz-Klassen genauer zu definieren, wurde zusätzlich auch ein linearer und ein cyclischer Ligand mit der Sequenz Klasse II in das Screening involviert (Peptide **20** und **21**).

Tab. 5. Sequenzen der Phosphopeptidliganden der zweiten Serie

Nr.	Peptidsequenz
16	EGLN _p YFVHfe
17	EGLN _p YNleVHfe
18	EGLK _p YFDHfe $\begin{array}{c} \\ \text{COCH}_2\text{NH} \\ \end{array}$
19	EGLK _p YNleDHfe $\begin{array}{c} \\ \text{COCH}_2\text{NH} \\ \end{array}$
20	EGLN _p YAVL
21	EGLK _p YADL $\begin{array}{c} \\ \text{COCH}_2\text{NH} \\ \end{array}$

5.2. Darstellung der Phosphopeptidliganden

5.2.1. Lineare Phosphopeptide

Festphasenpeptidsynthese

Die Synthese der ausgewählten Peptide wurde nach der Fmoc-Strategie unter Verwendung von Rink-Amid-MBHA-Harz (Beladung: 0,64 mml/g) als polymerem Träger hergestellt. Für die biologische Testung wurden die Sequenzen sowohl als N-terminal freie als auch als N-terminal biotinylierte Peptide synthetisiert.

Zur Herstellung von Phosphopeptiden unterscheidet man zwei Strategien [177]:

- 1.) Phosphorylierung des Tyrosins postsynthetisch an der ungeschützten Tyr-Seitenkette z.B. durch Phosphoramidite.
- 2.) Einbau von geschützten oder ungeschützten Phosphotyrosinbausteinen direkt während der Peptidsynthese.

Für Peptidsequenzen, die Met enthalten, wird in der Literatur die zweite Strategie favorisiert, da effiziente Phosphorylierungsreagenzien eine nachfolgende Oxidation (P^{III} - P^{V}) erfordern, wobei auch Met oder Trp oxidiert werden können. Außerdem können die konformationell eingeschränkten Aminosäuren sterisch eine effektive postsynthetische Phosphorylierung von Tyr behindern [177-179]. Für die Phosphopeptidliganden dieser Arbeit wurden deshalb Phosphotyrosinbausteine benutzt. Am Beispiel der Leitstruktur Ros poY^{2267} wurde die Effizienz des Einbaus des Monobenzyl-geschützten Fmoc-Tyr(PO(OBzl)OH)-OH mit der des freien Fmoc-Tyr(PO₃H₂)-OH verglichen [175]. Für beide Strategien wurden vergleichbare Kopplungsausbeuten ermittelt. Deshalb wurde für weitere Synthesen das kostengünstigere Phosphat-ungeschützte Fmoc-Tyr(PO₃H₂)-OH verwendet.

Es ist beschrieben, dass die ungeschützte Phosphatgruppe während der Kopplung mit Piperidin aus vorherigen Abspaltvorgängen der Fmoc-Schutzgruppe Piperidiniumsalze bilden kann [180]. Das bedeutet, dass weniger aktivierte Aminosäure im Kopplungsansatz

vorhanden ist. Um dies zu verhindern, werden zum einen zusätzlich Waschschrte vor der Kopplung des Fmoc-Tyr(PO_3H_2)-OH und zum anderen eine erhöhte Basenkonzentration (3 equ. vs. 2 equ. DIEA) in der Literatur empfohlen [180, 181]. Als geeignete Kopplungsreagenzien für den Phosphotyrosin-Baustein haben sich HBTU und HOBt herausgestellt, welche auch für die Kopplung der anderen Aminosäuren benutzt wurden. Im Falle der biotinylierten Peptidsequenzen wurde für die Kopplung des Biotins PyBOP verwendet [175] (Abb. 7.). Für die Fluoreszenz-Anisotropie-Messungen wurde die Ros poY^{2267} -Sequenz N-terminal durch 5-Carboxy-fluorescein verlängert (Peptid **22**). Die Kopplungsbedingungen entsprechen denen des Biotins.

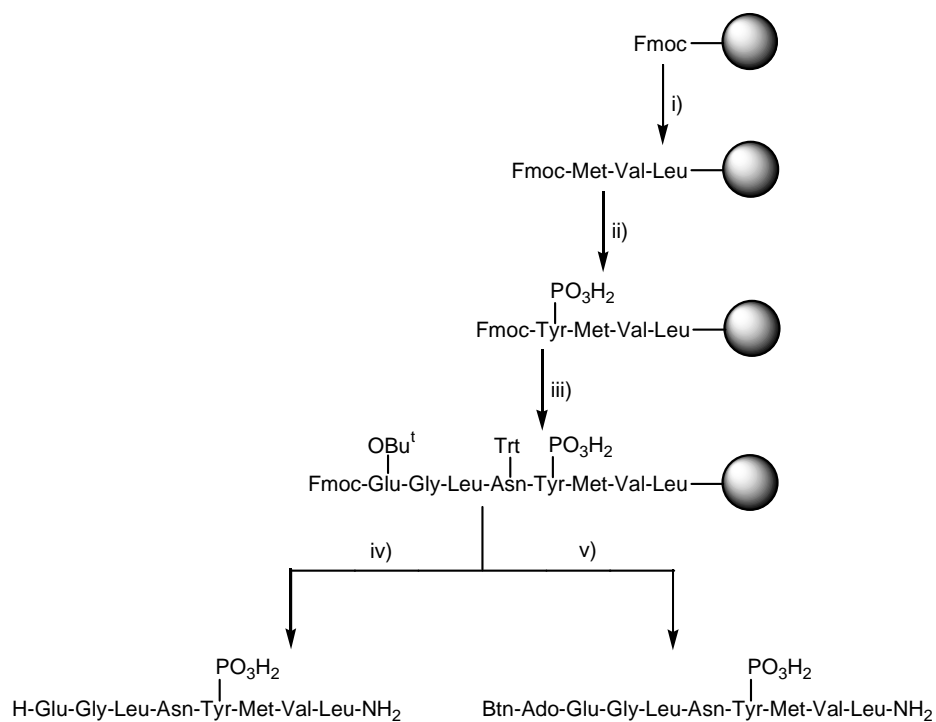


Abb. 7. Syntheschema zur Darstellung der linearen Phosphopeptide [175].

- i) 20 % Piperidin/DMF, Fmoc-Aminosäure/HBTU/HOBt/2 equ. DIEA/DMF
- ii) 20% Piperidin/DMF, Fmoc-Tyr(PO_3H_2)-OH/HBTU/HOBt/3 equ. DIEA/DMF
- iii) 20 % Piperidin/DMF, Fmoc-Aminosäure/HBTU/HOBt/2 equ. DIEA/DMF, Teilung des Harzes
- iv) 20 % Piperidin/DMF, 95 % TFA/ 2,5 % TIPS/ 2,5 % H_2O
- v) 20 % Piperidin/DMF, Fmoc-Ado/HBTU/HOBt/2 equ. DIEA/DMF, 20 % Piperidin/DMF, Biotin/PyBOP/DIEA/DMF, 95 % TFA/ 2,5 % TIPS/ 2,5 % H_2O

Charakterisierung der Peptide

Die Rohprodukte der Peptide wurden nach Abspaltung vom Harz mittels HPLC und MALDI-MS untersucht. Die Reinigung erfolgte durch semipräparative HPLC. Die Ergebnisse der analytischen Charakterisierung der Peptide durch MALDI-MS, Dünnschichtchromatographie und HPLC sind in Tabelle 6 dargestellt. Außerdem wurden Aminosäureanalysen durchgeführt. Die Ergebnisse entsprachen dem theoretischen Aminosäuregehalt der einzelnen Peptide. Da die für die Aminosäureanalyse eingesetzten Lösungen dieselben waren, die auch zur biologischen Testung genutzt wurden, konnte gleichzeitig auch die Konzentration der Lösung aus dem Peptidgehalt ermittelt werden.

Die HPLC-Analyse der Rohprodukte der Peptide **5**, **6**, **7** und **8** verdeutlichte, dass der Einbau verschiedener Diastereomere von Abu(β Ph) und Ser(β Ph) die Bildung mehrerer Peaks mit klar differenzierten Retentionszeiten verursachte. Zur Charakterisierung der einzelnen Peaks wurde das nach Totalhydrolyse vorliegende Aminosäuregemisch mit Marfey's Reagenz (1-Fluoro-2,4-Dinitrophenyl-5-L-alaninamid) umgesetzt und anschließend mittels HPLC analysiert [182, 175]. Die entsprechende Identifizierung der Peaks dieser Peptide ist in Tabelle 6 und 7 ersichtlich.

Tab. 6. Charakterisierung der freien linearen Phosphopeptidliganden [175, 183].

Nr.	Peptidsequenz	MW ^a		t _R ^d (min)	R _{f1} ^e	R _{f2} ^f
		theoret.	gefunden			
pY2267	EGLNpY β MVL	1016,4	1016,8	20,6	0,48	0,48
1	EGLNpYFVL	1033,1	1055,9 ^b	24,1	0,42	0,48
2	EGLNpYMFV	1051,1	1089,7 ^b	23,0	0,34	0,34
3	EGLNpY-Hfe-VL	1046,5	1070,3 ^b	26,1	0,54	0,53
4	EGLNpY β MV-Hfe	1064,4	1088,5 ^b	24,0	0,52	0,51
5a	EGLNpY-L-threo-Abu(β Ph)-VL	1046,5	1070,3 ^b	24,8	0,39	0,48
5b	EGLNpY-L-erythro-Abu(β Ph)-VL	1046,5	1070,1 ^b	25,7	0,39	0,52
5c	EGLNpY-D-threo-Abu(β Ph)-VL	1046,5	1070,4 ^b	28,9	0,41	0,57
5d	EGLNpY-D-erythro-Abu(β Ph)-VL	1046,5	1084,3 ^b	30,0	0,40	0,59
6a	EGLNpY β MV-L-threo/erythro-Abu(β Ph)	1064,4	1088,3 ^b	23,6	0,55	0,52
6b	EGLNpY β MV-D-threo/erythro-Abu(β Ph)	1064,4	1088,5 ^b	25,3	0,54	0,52
7a	EGLNpY-L-threo-Ser(β Ph)-VL	1049,1	1050,2	22,2	0,33	0,47
7b	EGLNpY-D-threo-Ser(β Ph)-VL	1049,1	1050,1	25,9	0,34	0,55
8a	EGLNpY β MV-L-threo-Ser(β Ph)	1066,4	1067,9	21,3	0,46	0,51
8b	EGLNpY β MV-D-threo-Ser(β Ph)	1066,4	1090,2 ^b	22,7	0,50	0,64
9	EGLNpY-Nle-VL	1032,5	1055,8 ^b	24,6	0,36	0,56
10	EGLNpYFVF	1067,1	1068,2	25,8	0,42	0,49
11	EGLNpYMYF	1113,1	1138,1 ^b	21,7	0,40	0,44
12	EGLNpY-Tic-I-Tic	1104,5	1128,6 ^b	27,5	0,35	0,59
16	EGLNpYFVHfe	1081,0	1104,6 ^b	27,4	0,47	0,60
17	EGLNpYNleVHfe	1047,0	1070,7 ^b	26,8	0,46	0,57
20	EGLNpYAVL	956,9	996,5 ^c	17,5	0,42	0,46
22	CF-EGLNpY β MVL	1375,3	1398,6 ^b	30,5	0,53	0,25

^a[M+H]⁺; ^b[M+Na]⁺; ^c[M+K]⁺; ^dBedingungen: 10 – 50 % Eluent B in 40 min (A: 0,1 % TFA/H₂O, B: 0,1 % TFA/Acetonitril), ^eSystem 1: n-Butanol/Essigsäure/Wasser 48:18:24; ^fSystem 2: Pyridin/Essigester/Essigsäure/Wasser 5:5:1:3

In Tabelle 7 sind die Daten der analytischen Charakterisierung der biotinylierten linearen Peptide zusammengefasst.

Tab. 7. Charakterisierung der biotinylierten linearen Phosphopeptidliganden.

Nr.	Peptidsequenz	MW ^a (g/mol)		t _R ^d (min)	R _{f1} ^e	R _{f2} ^f
		theoret.	gefunden			
pY2267	Btn-Ado-EGLNpYMVL	1388,8	1427,7 ^c	20,62	0,39	0,33
1	Btn-Ado-EGLNpYFVL	1405,3	1427,4 ^b	26,8	0,40	0,29
2	Btn-Ado-EGLNpYMFV	1423,2	1461,3 ^c	25,9	0,41	0,29
3	Btn-Ado-EGLNpY-Hfe-VL	1418,8	1458,1 ^c	28,6	0,33	0,23
4	Btn-Ado-EGLNpYMV-Hfe	1436,8	1460,0 ^b	26,3	0,33	0,2
5a	Btn-Ado-EGLNpY-L-threo-Abu(βPh)-VL	1416,9	1457,4 ^c	27,3	0,34	0,26
5b	Btn-Ado-EGLNpY-L-erythro-Abu(βPh)-VL	1416,9	1441,5 ^b	28,1	0,33	0,27
5c	Btn-Ado-EGLNpY-D-threo-Abu(βPh)-VL	1416,9	1441,9 ^b	29,8	0,36	0,23
5d	Btn-Ado-EGLNpY-D-erythro-Abu(βPh)-VL	1416,9	1442,0 ^b	30,7	0,34	0,27
6a	Btn-Ado-EGLNpYMV-L-threo/erythro-Abu(βPh)	1436,8	1088,3 ^b	26,2	0,37	0,23
6b	Btn-Ado-EGLNpYMV-D-threo/erythro-Abu(βPh)	1436,8	1460,3 ^b	27,4	0,34	0,22
7a	Btn-Ado-EGLNpY-L-threo-Ser(βPh)-VL	1421,4	1459,6 ^b	30,9	0,31	0,22
7b	Btn-Ado-EGLNpY-D-threo-Ser(βPh)-VL	1421,4	1443,5 ^b	33,1	0,33	0,26
8a	Btn-Ado-EGLNpYMV-L-threo-Ser(βPh)	1436,8	1462,0 ^b	22,8	0,34	0,28
8b	Btn-Ado-EGLNpYMV-D-threo-Ser(βPh)	1436,8	1462,0 ^b	23,8	0,37	0,27
9	Btn-Ado-EGLNpY-Nle-VL	1404,8	1403,8 ^b	28,6	0,30	0,22
10	Btn-Ado-EGLNpYFVF	1439,2	1461,9 ^b	28,1	0,41	0,30
11	Btn-Ado-EGLNpYMYF	1485,2	1524,2 ^c	24,5	0,39	0,28
12	EGLNpY-Tic-I-Tic	1476,8	1500,5 ^b	29,0	0,35	0,26
16	Btn-Ado-EGLNpYFVHfe	1452,3	1476,3 ^b	29,4	0,41	0,36
17	Btn-Ado-EGLNpYNleVHfe	1418,3	1442,6 ^b	29,0	0,42	0,33
20	Btn-Ado-EGLNpYAVL	1329,1	1352,2 ^b	21,8	0,38	0,31
23	Btn-Ado-EGLNYMVL	1308,6	1331,6 ^b	28,0	0,53	0,35

^a[M+H]⁺; ^b[M+Na]⁺; ^c[M+K]⁺; ^dBedingungen: 10 – 60 % Eluent B in 50 min (A: 0,1 % TFA/H₂O, B: 0,1 % TFA/Acetonitril), ^eSystem 1: n-Butanol/Essigsäure/Wasser 48:18:24; ^fSystem 2: Pyridin/Essigester/Essigsäure/Wasser 5:5:1:3

5.2.1. Cyclische Phosphopeptide

Festphasenpeptidsynthese

Die Cyclisierung wurde zwischen der Aminogruppe des Lys in *poY*-1 und der Carboxylgruppe von Asp bzw. Glu in *poY*+2 unter Ausbildung einer Lactambrücke erreicht. Dafür war es notwendig, die Seitenketten der zu verbrückenden Aminosäuren selektiv zu schützen. Als Schutzgruppe wurde der Alloc/OAll-Typ ausgewählt, der sich bereits in anderen Seitenketten-cyclisierten Peptiden bewährt hat [184]. Für die Kopplung der Verbrückungseinheit Gly an Asp (Asp(Gly-OAll)), Glu (Glu-(Gly-OAll)) oder an Lys (Lys(Gly-Alloc)) standen zwei mögliche Synthesestrategien zur Auswahl (Abb. 9):

- 1) Die Kopplung des H-Gly-OAll-Bausteines an z.B. ungeschütztes Fmoc-Asp-OH der wachsenden Peptidkette am Harz (Strategie A).
- 2) Die Synthese des Dipeptidblockes z.B. Asp(Gly-OAll) in Lösung mittels gemischter Anhydrid-Methode (Abb. 8) und anschließender Kopplung des Bausteines an die wachsende Peptidkette am Harz (Strategie B).

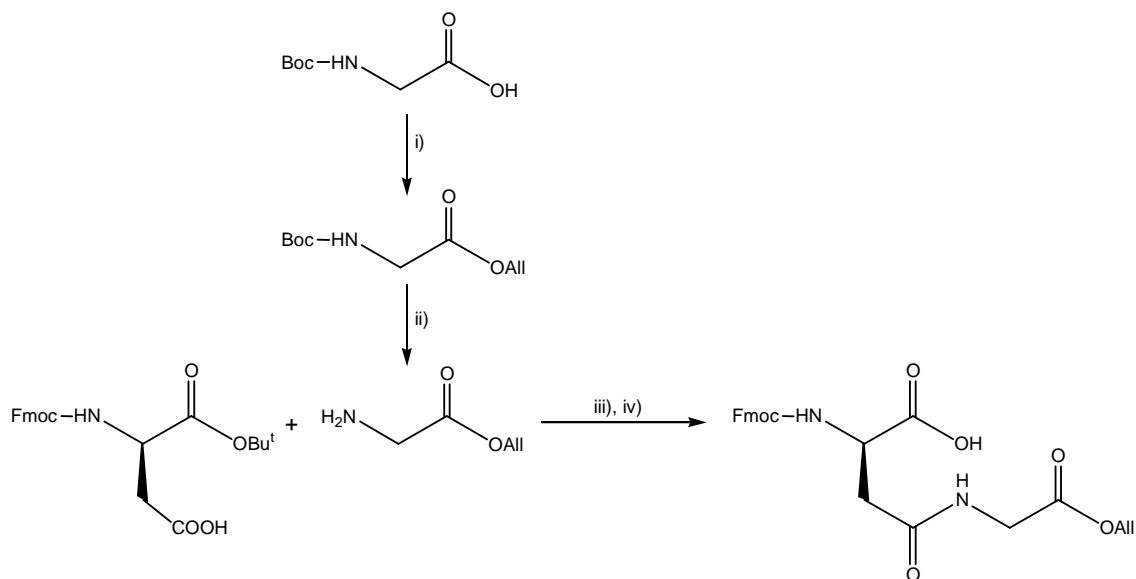


Abb. 8. Syntheschema zur Darstellung der Dipeptidbausteine Fmoc-Asp(Gly-OAll) und Fmoc-Glu(Gly-OAll) [175].

- i) Allylalkohol/DCC
- ii) 50 % TFA/DCM
- iii) Isobutylchloroformiat/NMM/THF
- iv) 50 % TFA/DCM

Die Kopplung mit Strategie A führte zur Bildung von Fehlsequenzen, während mit Strategie B sowohl für Asp(Gly-OAll) als auch für Glu(Gly-OAll) hohe Ausbeuten an gereinigtem Dipeptidbaustein erhalten wurden. Deshalb wurde für die weiteren Synthesen der cyclischen Phosphopeptidliganden Strategie B genutzt (Abb. 9).

Als Phosphotyrosinbaustein wurde, wie in der Literatur vorgeschlagen, Monobenzylgeschütztes Phosphotyrosin eingesetzt [156, 185-188].

HBTU/HOBt wurden erneut als Kopplungsreagenzien verwendet. Einzig für die Kopplung des Dipeptidbausteines und der Anknüpfung der anschließenden Aminosäure wurde PyBOP benutzt [176]. Für die Herstellung der N-terminal-freien Peptidliganden war es nötig, nach Fertigstellung der Oktapeptidsequenz die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe durch die Boc-Schutzgruppe zu ersetzen [189]. Für die Cyclisierung der Boc-geschützten oder biotinylierten Peptide wurde nach Abspaltung der Alloc/OAll-Schutzgruppe [184] erneut PyBOP und DIEA genutzt (Abb. 9).

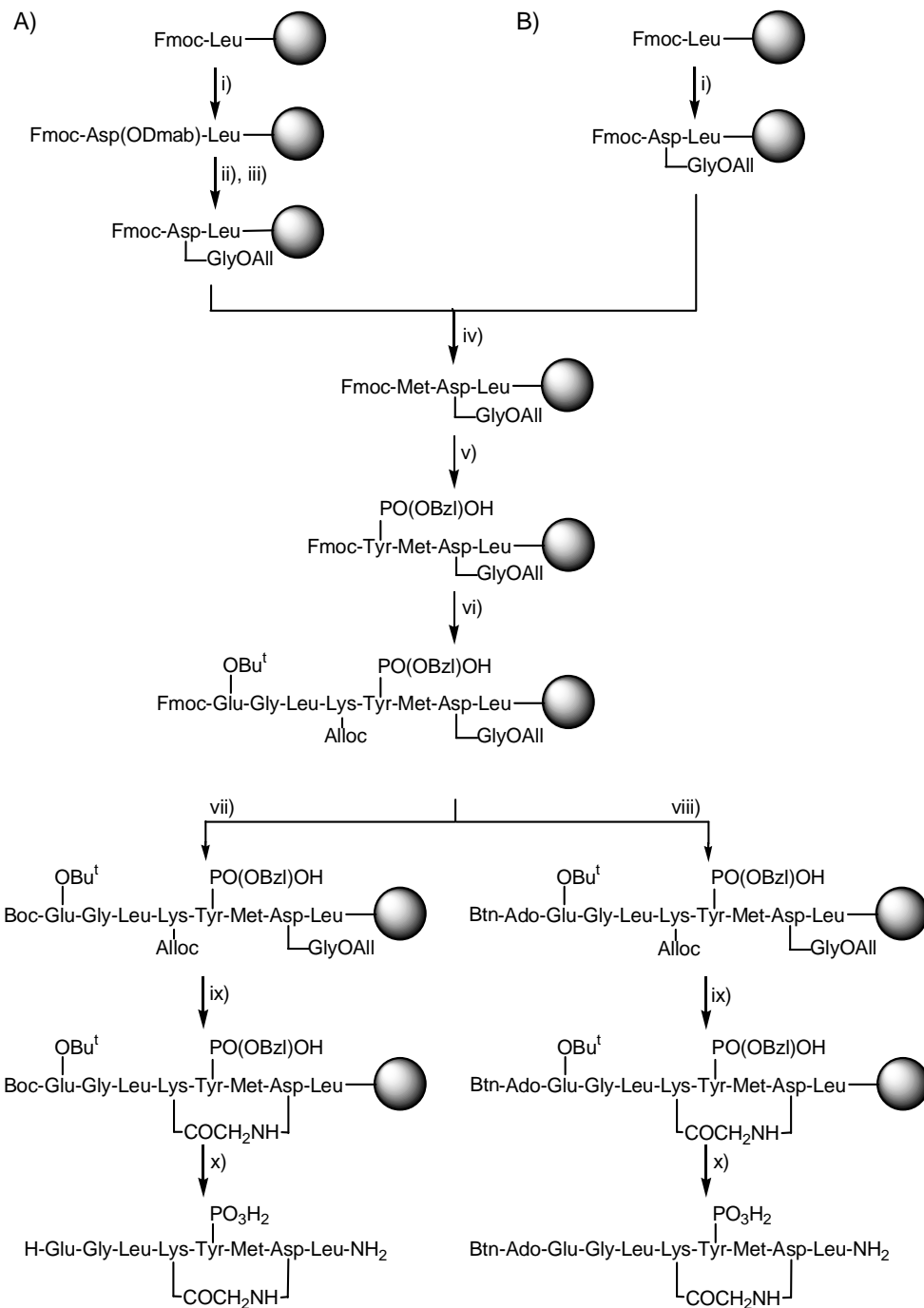


Abb. 9. Syntheschema zur Darstellung der cyclischen Phosphopeptidliganden [175].

- i) Strategie A: 20 % Piperidin/DMF, Fmoc-Asp(ODmab)/HBTU/HOBt/DIEA/DMF
- i) Strategie B: 20 % Piperidin/DMF, Fmoc-Asp(Gly-OAll)-OH/PyBOP/HOBt/DIEA/DMF
- ii) 2 % Hydrazin/DMF, 5 % DIEA/DMF
- iii) PyBOP/HOBt/DIEA/DMF, H-Gly-OAll
- iv) 20 % Piperidin/DMF, Fmoc-Aminosäure/PyBOP/HOBt/DIEA
- v) 20 % Piperidin/DMF, Fmoc-Tyr(PO(OBzl)OH)-OH/HBTU/HOBt/DIEA/DMF
- vi) 20 % Piperidin/DMF, Fmoc-Aminosäure/PyBOP/HOBt/DIEA
- vii) 20 % Piperidin/DMF, (Boc)₂O/DIEA/DMF
- viii) 20 % Piperidin/DMF, Fmoc-Ado/HBTU/HOBt/DIEA/DMF, 20 % Piperidin/DMF, Biotin/PyBOP/DIEA/DMF
- ix) Pd(PPh₃)₄, DMF/THF/0,5N HCl/Morpholin (2:2:1:0,9), PyBOP/DIEA/DMF
- x) 95 % TFA/ 2,5 % H₂O, 2,5 % TIPS

Charakterisierung der cyclischen Peptide

Die Peptide wurden vom Harz abgespalten und analog der linearen Sequenzen mittels HPLC und MALDI-MS untersucht. Die Reinigung erfolgte durch semipräparative HPLC. Die Ergebnisse der analytischen Charakterisierung der Peptide durch MALDI-MS, Dünnschichtchromatographie und HPLC sind in Tabelle 8 und Tabelle 9 dargestellt [175].

Tab. 8. Charakterisierung der freien cyclischen Peptidliganden [175, 183].

Nr.	Peptidsequenz	MW ^a (g/mol)		t _R ^d (min)	R _f ^e	R _f ^f
		theoret.	gefunden			
13	EGLK _p YMDL COCH ₂ NH	1086,2	1109,5 ^b	18,8	0,45	0,57
14	EGLK _p YMEL COCH ₂ NH	1100,2	1101,4 ^b	19,4	0,47	0,59
15	EGLK _p YMEL 	1043,1	1066,3 ^b	18,3	0,50	0,65
18	EGLK _p YFDHfe COCH ₂ NH	1132,2	1173,0 ^c	26,5	0,45	0,57
19	EGLK _p YNleDHfe COCH ₂ NH	1099,2	1138,8 ^c	25,1	0,45	0,60
21	EGLK _p YADL COCH ₂ NH	1009,0	1032,0 ^b	15,6	0,39	0,48

^a[M+H]⁺; ^b[M+Na]⁺; ^c[M+K]⁺; ^dBedingungen: 10 – 50 % Eluent B in 40 min (A: 0,1 % TFA/H₂O, B: 0,1 % TFA/Acetonitril), ^eSystem 1: n-Butanol/Essigsäure/Wasser 48:18:24; ^fSystem 2: Pyridin/Essigester/Essigsäure/Wasser 5:5:1:3

Tab. 9. Charakterisierung der biotinylierten cyclischen Peptidliganden.

Nr.	Peptidsequenz	MW ^a (g/mol)		t _R ^d (min)	R _{f1} ^e	R _{f2} ^f
		theoret.	gefunden			
13	Btn-Ado-EGLK _p YMDL COCH ₂ NH	1485,2	1481,2 ^b	22,3	0,37	0,41
14	Btn-Ado-EGLK _p YMEL COCH ₂ NH	1472,1	1495,1 ^b	23,0	0,37	0,30
15	Btn-Ado-EGLK _p YMEL 	1414,4	1437,9 ^b	22,0	0,36	0,29
18	Btn-Ado-EGLK _p YFDHfe COCH ₂ NH	1505,5	1544,0 ^c	28,6	0,37	0,37
19	Btn-Ado-EGLK _p YNleDHfe COCH ₂ NH	1471,5	1473,5	27,7	0,36	0,34
21	Btn-Ado-EGLK _p YADL COCH ₂ NH	1381,4	1383,1	20,7	0,28	0,37

^a[M+H]⁺; ^b[M+Na]⁺; ^c[M+K]⁺; ^dBedingungen: 10 – 60 % Eluent B in 50 min (A: 0,1 % TFA/H₂O, B: 0,1 % TFA/Acetonitril), ^eSystem 1: n-Butanol/Essigsäure/Wasser 48:18:24; ^fSystem 2: Pyridin/Essigester/Essigsäure/Wasser 5:5:1:3

5.3. Biologische Testung

5.3.1. Stimulation der Phosphataseaktivität von SHP-1

Im Vergleich zur Konsensussequenz Klasse I enthält Ros poY^{2267} in Position $poY+3$ statt Phe oder Nle (Met) ein Leu. In $poY+1$ wird neben dem in der Ros poY^{2267} -Sequenz enthaltenen Met (Nle) auch bevorzugt Phe gebunden. Die Screenings der kombinatorischen Peptidbibliotheken bewerten jedoch nur die Bindungseigenschaften der Domäne und lassen keine Aussage über die biologische Aktivität der Liganden zu. In einem Phosphataseaktivitätsassay sollte nun die Frage geklärt werden, welche Aminosäuren nach Bindung den zur Aktivierung benötigten Konformationswechsel einleiten. Dazu wurden schrittweise Aminosäuren der Sequenz des hochaffinen Liganden Ros poY^{2267} substituiert und deren Fähigkeit, SHP-1 zu aktivieren, bestimmt. Um die Güte der Substitution zu bewerten, wurde die Aktivität relativ zur Leitstruktur Ros poY^{2267} angegeben (Tab. 10).

SHP-1 wurde als rekombinantes GST-Fusionsprotein in *E. coli* überexprimiert und über GSH-Sepharose aufgereinigt. Anschließend wurde der GST-Tag durch Behandlung mit Faktor Xa abgetrennt, um möglichst den physiologischen Bedingungen zu entsprechen. Als Substrat wurde das niedrigmolekulare *p*-Nitrophenylphosphat genutzt, das nach Dephosphorylierung zu *p*-Nitrophenol aufgrund seiner gelben Färbung photometrisch nachgewiesen werden kann.

5.3.1.1. Aktivierung der Phosphatase durch lineare Phosphopeptide

Erste Serie an linearen Liganden

Der niedrigere EC_{50} -Wert des Peptids **9** im Vergleich zu dem von Ros poY^{2267} bestätigt zum einen, dass Nle ein idealer Ersatz für Met ist, und zeigen zum anderen, dass eine Verstärkung des hydrophoben Charakters eine deutlichere Aktivierung der Phosphatase verursacht (Vergleich Peptid **9** vs. Peptid **2**).

Der Einbau der in der Konsensussequenz angegebenen Aminosäure Phe in die Positionen $poY+1$ und $poY+3$ des Ros poY^{2267} -Liganden führte ebenfalls zu stark aktivierenden Liganden (Peptid **10**, Abb. 10). Es konnte jedoch keine weitere Aktivierung der Phosphatase im Konzentrationsbereich über 200 μ M erreicht werden. Dieses Phänomen wurde auch von anderen Arbeitsgruppen für stark aktivierende Liganden beschrieben [33].

Eine Änderung in Position $poY+2$ beeinflusst die Phosphataseaktivität kaum. Obwohl in den Screenings der Peptidbibliotheken eine geringe Selektivität für Tyr in dieser Position ermittelt wurde, kann der Tyr-Rest in Peptid **11** nicht mit einer spezifischen Tasche interagieren und so auch nicht die Phosphataseaktivität entscheidend verändern.

Eine Substitution der $poY+1$ und $poY+3$ Positionen innerhalb der Sequenz des Ros poY^{2267} mit Phe in $poY+1$ und Hfe in $poY+3$ führte ebenfalls zu stärker aktivierenden Liganden (Abb. 10, Tab. 10). Eine Superpositionierung der Liganden **1** und **3** im gebundenen Zustand verdeutlichte, dass die Orientierung des Phenylringes vom Phe/Hfe in beiden Peptiden unterschiedlich ist. Das um eine Methylgruppe in der Seitenkette verlängerte Phe-Analogen Hfe kann nicht optimal mit der Bindungstasche interagieren und verschiebt auch geringfügig die Positionen der anderen Aminosäuren im Liganden zur SH2-Domäne. In $poY+3$ wird Hfe dagegen besser als Leu (Ros poY^{2267}) und Phe (Peptid **2**) toleriert, möglicherweise erlaubt diese Region im Protein eine sterisch anspruchsvollere Seitenkette.

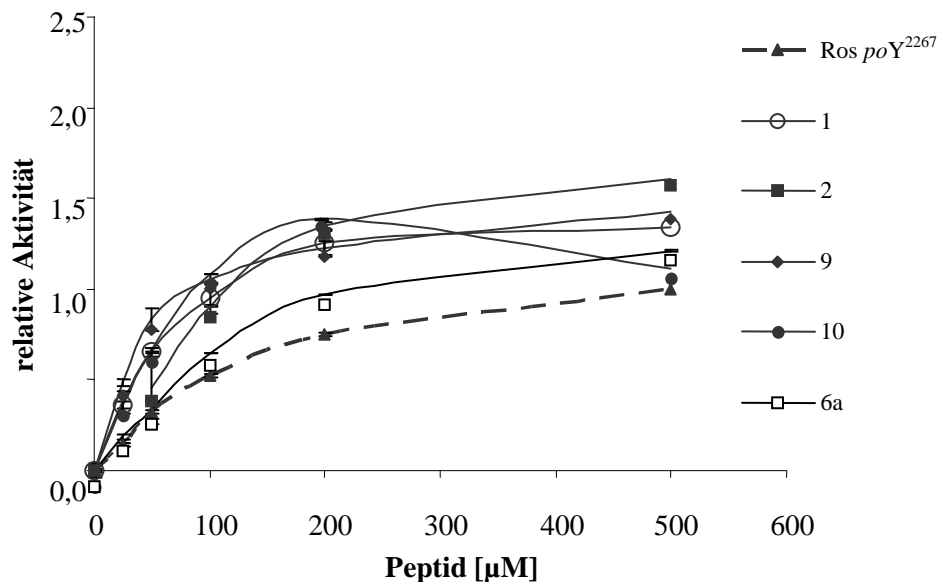


Abb. 10. Stimulation von SHP-1 durch die im Vergleich zu Ros poY^{2267} stärker aktivierenden Phosphopeptide 1, 2, 9, 10, 6a [176].

Die Stimulierung der SHP-1-Aktivität (15 nM Endkonzentration) erfolgte unter Verwendung verschieden konzentrierter Peptidlösungen (0-500 μM) und pNPP (10 mM, Reaktionszeit 30 min). Die Menge des entstandenen p-Nitrophenolat-Anions wurde bei 405 nm bestimmt und relativ zur Absorption von Ros poY^{2267} bei 500 μM angegeben.

Tab. 10. Ergebnisse des Phosphataseaktivitätstests und der Biacore-Messungen [176, 183].

Nr.	Peptidsequenz	EC ₅₀ (μ M) ^a	K _D (μ M) (GST-N-SH2) ^b	K _D (μ M) (GST-C-SH2) ^c
pY2267	EGLNpYMV L	160	1,44 \pm 0,45	2,44 \pm 0,97
1	EGLNpYFVL	70	0,69 \pm 0,21	- ^d
2	EGLNpYMV F	140	1,00 \pm 0,01	- ^d
3	EGLNpY- Hfe -VL	140	0,90 \pm 0,39	- ^d
4	EGLNpYMV- Hfe	75	0,27 \pm 0,10	- ^d
5a	EGLNpY- L-threo-Abu (β Ph)-VL	50	0,24 \pm 0,13	- ^d
5b	EGLNpY- L-erythro-Abu (β Ph)-VL	220	0,16 \pm 0,11	- ^d
5c	EGLNpY- D-threo-Abu (β Ph)-VL	n.a. ^e	n.b. ^f	- ^d
5d	EGLNpY- D-erythro-Abu (β Ph)-VL	n.a. ^e	n.b. ^f	- ^d
6a	EGLNpYMV- L-threo/erythro-Abu (β Ph)	70-80	0,25 \pm 0,01	- ^d
6b	EGLNpYMV- D-threo/erythro-Abu (β Ph)	n.a.	n.b. ^f	- ^d
7a	EGLNpY- L-threo-Ser (β Ph)-VL	220	1,08 \pm 0,10	- ^d
7b	EGLNpY- D-threo-Ser (β Ph)-VL	n.a.	n.b. ^f	- ^d
8a	EGLNpYMV- L-threo-Ser (β Ph)	85	0,29 \pm 0,02	- ^d
8b	EGLNpYMV- D-threo-Ser (β Ph)	n.a.	n.b.	- ^d
9	EGLNpY- Nle -VL	50-60	0,23 \pm 0,10	- ^d
10	EGLNpYFVF	50	0,12 \pm 0,02	- ^d
11	EGLNpYMYF	150	0,53 \pm 0,11	- ^d
12	EGLNpY- Tic-I-Tic	n.a. ^e	n.b. ^f	- ^d
13	EGLKpYMDL COCH ₂ NH	n.a. ^e	0,11 \pm 0,01	1,01 \pm 0,19
14	EGLKpYME L COCH ₂ NH	n.a. ^e	0,21 \pm 0,07	1,35 \pm 0,13
15	EGLKpYME L COCH ₂ NH	n.a. ^e	n.b. ^f	- ^d
16	EGLNpYFV Hfe	17	0,09 \pm 0,01	- ^d
17	EGLNpYN leVHfe	47	0,11 \pm 0,15	- ^d
18	EGLKpYFD Hfe COCH ₂ NH	31	0,06 \pm 0,01	6,43 \pm 1,16
19	EGLKpYN leDHfe COCH ₂ NH	49	0,06 \pm 0,01	3,33 \pm 1,18
20	EGLNpYAVL	124	0,39 \pm 0,07	1,00 \pm 0,48
21	EGLKpYADL COCH ₂ NH	123	0,70 \pm 0,12	1,41 \pm 0,61

^aDie Auswertung der Aktivierungskurven erfolgte mit Grafit 3.0. ^bDie K_D-Werte sind unter Verwendung des *separate fit*- und *steady state*-Modells (BIAevaluation Software 3.0) bestimmt worden. ^cFür die Auswertung der GST-C-SH2-Domäne konnte ausschließlich der *separate fit* (BIAevaluation Software) benutzt werden. ^dDaten wurden nicht ermittelt. ^en.a.: nicht aktiv, ^fn.b.: nicht bindend

Wie auch schon in den Modellierungsstudien deutlich wurde, können Phosphopeptidliganden, die D-Aminosäuren in den für die Interaktion relevanten $poY+1$ und $poY+3$ Positionen enthalten, die Phosphatase nicht aktivieren. Die D-Aminosäuren (Peptid **5c**, **5d**, **6b**, **7b**, **8b**) bewirken veränderte Seitenkettenkonformationen, die für die Bindung ungünstig sind. Obwohl für die *erythro*- und *threo*-Form von Abu(β Ph) in der $poY+1$ Position des Liganden in den Modellierungs-Studien keine Unterschiede in den freien Bindungsenergien berechnet wurden, zeigten die Peptide **5a** und **5b** sehr unterschiedliche Aktivitäten im pNPP-Assay (Abb. 11, Tab. 10). Eine Einpassung dieser Liganden in die N-SH2-Domäne veranschaulichte, dass die unterschiedliche Orientierung des Phenylrings des Abu(β Ph) die im Vergleich zu Phe zusätzliche Methylgruppe am C^β -Atom im Falle des L-*threo*-Abu(β Ph) so positioniert, dass sie zusätzliche Kontakte mit der Domäne ausbilden kann [176]. Peptid **5a** konnte wie Peptid **10** im Konzentrationsbereich über 200 μ M nicht weiter aktiviert werden. Für Peptid **6** konnte keine Trennung der *erythro*- und der *threo*-Form von L-Abu(β Ph) erreicht werden. Eine Mischung der *erythro*/*threo*-Form in $poY+3$ (Peptid 6a) führte zu einem im Vergleich zu Ros poY^{2267} stärker aktivierenden Liganden (Tab. 10).

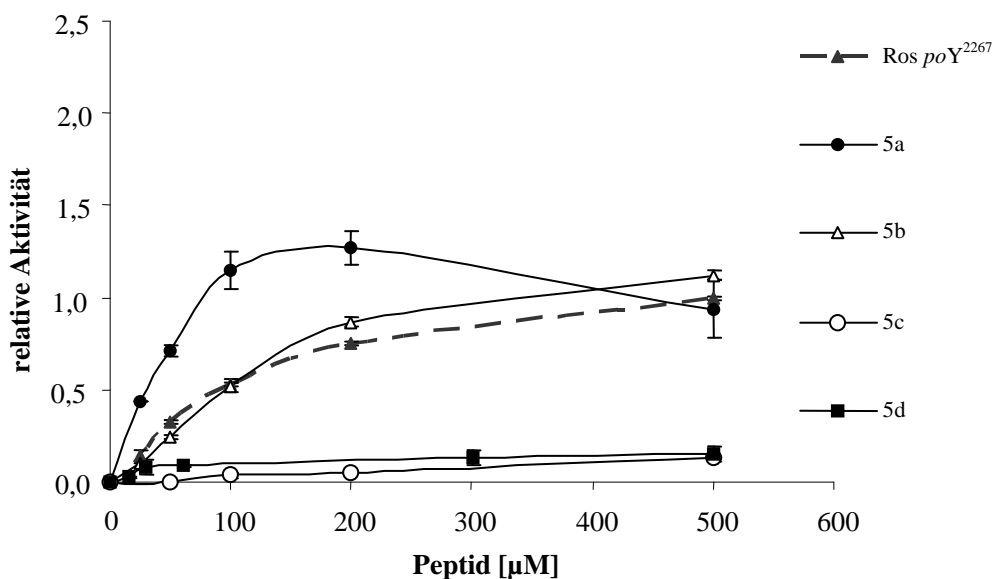


Abb. 11. Stimulation von SHP-1 durch Phosphopeptide unterschiedlicher Konfiguration (5a, -b, -c, -d) im Vergleich zu Ros poY^{2267} [176].

Die Stimulierung der SHP-1-Aktivität (15 nM Endkonzentration) erfolgte unter Verwendung verschieden konzentrierter Peptidlösungen (0-500 μ M) und pNPP (10 mM, Reaktionszeit 30 min). Die Menge des entstandenen p-Nitrophenolat-Anions wurde bei 405 nm bestimmt und relativ zur Absorption von Ros poY^{2267} bei 500 μ M angegeben.

Die Substitution von Met in Position $poY+1$ durch Ser(β Ph) war hinsichtlich der biologischen Aktivierung nicht erfolgreich (Peptid **7**). Dagegen zeigte der Ligand mit Ser(β Ph) in $poY+3$ (Peptid **8a**) eine stärkere Aktivierung der Phosphatase bei deutlich niedrigeren

Konzentrationen als für Ros poY^{2267} (Tab. 10). Als Phe-Analogon enthält Ser(β Ph) eine zusätzliche Hydroxylgruppe am C^β -Atom, wodurch die Bindung an die N-SH2-Domäne zusätzlich stabilisiert werden kann. Das konformationsstabilisierte Phe-Analogon Tic erwies sich als ungeeigneter Substituent. Peptid **12**, welches Tic sowohl in $poY+1$ und $poY+3$ enthält, aktivierte SHP-1 deutlich schlechter. Dies bestätigt die Aussagen der Modellierung, dass aufgrund sterischer Hinderung keine Assoziation mit der Domäne möglich ist.

Zusammenfassung der Ergebnisse der ersten Serie von linearen Phosphopeptidliganden:

- 1.) In Position $poY+1$ führt eine Substitution von Met durch hydrophobe aromatische Aminosäuren wie Phe, *L-threo*-Abu(β Ph) und dem Met-Analogon Nle zu stärker aktivierenden Liganden.
- 2.) In Position $poY+3$ konnte der Einbau der nichtproteinogenen Aminosäuren *L-threo/erythro*-Abu(β Ph), *L-threo*-Ser(β Ph) und Hfe sowohl im Vergleich zur Leitstruktur mit Leu als auch zu dem in der Konsensussequenz vorgeschlagenen Phe zu aktiveren Liganden führen.
- 3.) Die Konfiguration der Aminosäuren hat entscheidenden Einfluss auf die Wirksamkeit der Liganden. So sind nur L-Aminosäuren in den Positionen $poY+1$ und $poY+3$ in der Lage, die Phosphatase zu aktivieren. Außerdem können durch weitere chirale Zentren zusätzliche stereochemisch-spezifische Interaktionen stattfinden.

Zweite Serie von linearen Liganden

Es sollte nun überprüft werden, ob Peptidliganden mit einer Kombination der aus der ersten Serie ermittelten optimalen Aminosäuren in den Positionen $poY+1$ und $poY+3$ in der Lage sind, die Phosphatase noch stärker zu aktivieren. Möglicherweise führen eine perfekte Ausfüllung der Bindungstaschen und die im Vergleich zur Leitstruktur entstehenden zusätzlichen Interaktionen mit der N-SH2-Domäne zu Superagonisten.

Da die Reinigung und Charakterisierung der Peptidliganden, die Abu(β Ph) und Ser(β Ph) enthalten, sehr kosten- und zeitaufwendig war und im Vergleich zu Phe und Nle in $poY+1$ und Hfe in $poY+3$ keine erhöhte Aktivität ermittelt wurde, wurde auf deren weiteren Einsatz verzichtet. In die Peptidliganden der zweiten Serie wurden die Position $poY+1$ mit Nle bzw. Phe und die $poY+3$ Position durch Hfe substituiert.

Zusätzlich wurde ein Peptidligand mit der Konsensussequenz Klasse II synthetisiert, um die Aktivität beider Klassen zu vergleichen.

Sowohl Peptid **16** als auch Peptid **17** aktivierten die Phosphatase bereits in niedrigen Konzentrationen. Die ermittelten EC_{50} -Werte (Peptid **16**: 17 μM und Peptid **17**: 47 μM) unterschreiten deutlich die der Peptidliganden der ersten Serie. Konzentrationen über 100 μM (Peptid **16**) bzw. 200 μM (Peptid **17**) inhibierten jedoch die Phosphataseaktivität, so dass keine Steigerung der maximalen Aktivierung von SHP-1 eintrat. Möglicherweise interagieren nach Aktivierung der Phosphatase optimale N-SH2-Domänen-Liganden aufgrund von partiellen Übereinstimmungen in der Erkennungssequenz auch mit der PTP-Domäne und konkurrieren mit pNPP um die Substratbindungsstelle. Im Gegensatz zu Phosphopeptidliganden aus der Aktivierungsschleife von Ros (Y^{2103} , Y^{2107} und Y^{2108}) [194] stellen die in dieser Arbeit untersuchten Liganden, die basierend auf einer Sequenz im C-Terminus von Ros (Y^{2267}) entwickelt wurden, nur schlechte Substrate dar. Peptid **20**, dessen Sequenz der Konsensussequenz Klasse II entspricht, führt verglichen mit den hochaktiven Liganden der Konsensussequenz Klasse I zu einer geringeren maximalen Aktivierung der Phosphatase, der EC_{50} -Wert liegt jedoch im selben Konzentrationsbereich wie der von Ros poY^{2267} (Abb. 12).

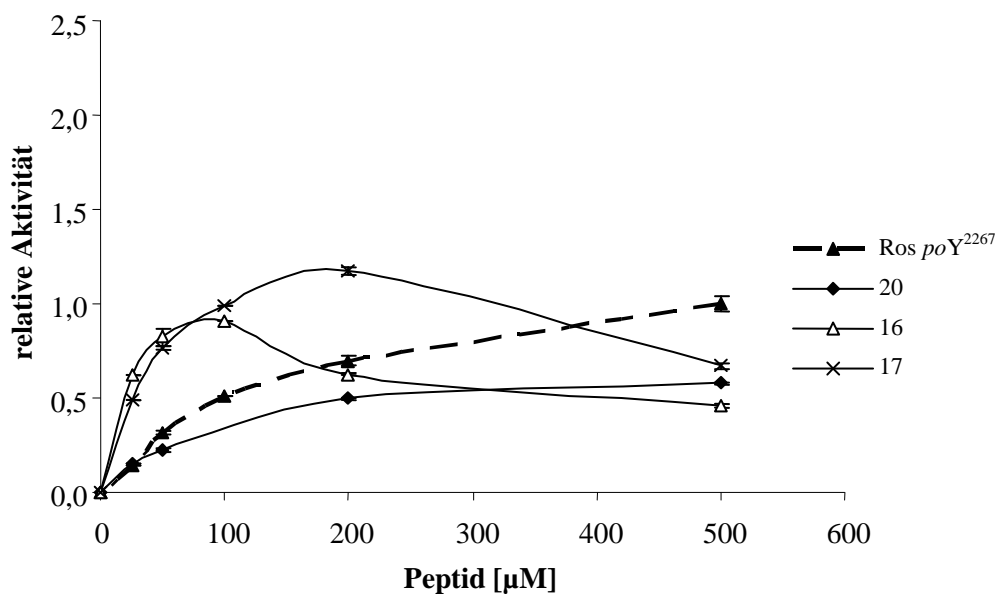


Abb. 12. Aktivierung von SHP-1 durch die linearen Phosphopeptide der zweiten Serie 16, 17, 20 im Vergleich zu Ros poY^{2267} [183].

Die Stimulierung der SHP-1-Aktivität (15 nM Endkonzentration) erfolgte unter Verwendung verschieden konzentrierter Peptidlösungen (0-500 μM) und pNPP (10 mM, Reaktionszeit 30 min). Die Menge des entstandenen p-Nitrophenolat-Anions wurde bei 405 nm bestimmt und relativ zur Absorption von Ros poY^{2267} bei 500 μM angegeben.

5.3.1.2. Aktivierung der Phosphatase durch cyclische Phosphopeptide

Erste Serie von Liganden

Aus den Modellierungsstudien wurde geschlussfolgert, dass Peptid **15** aufgrund der veränderten Peptidkonformation die Phosphatase nur gering aktivieren kann. Überraschenderweise stimulierten jedoch auch die Peptidliganden **13** und **14**, die durch Einbau eines Gly in die Verbrückungseinheit eigentlich flexibel genug sein sollten, um die zur Bindung und Aktivierung benötigte Konformation einzunehmen, die Phosphatase nur sehr gering (Abb. 13) [176].

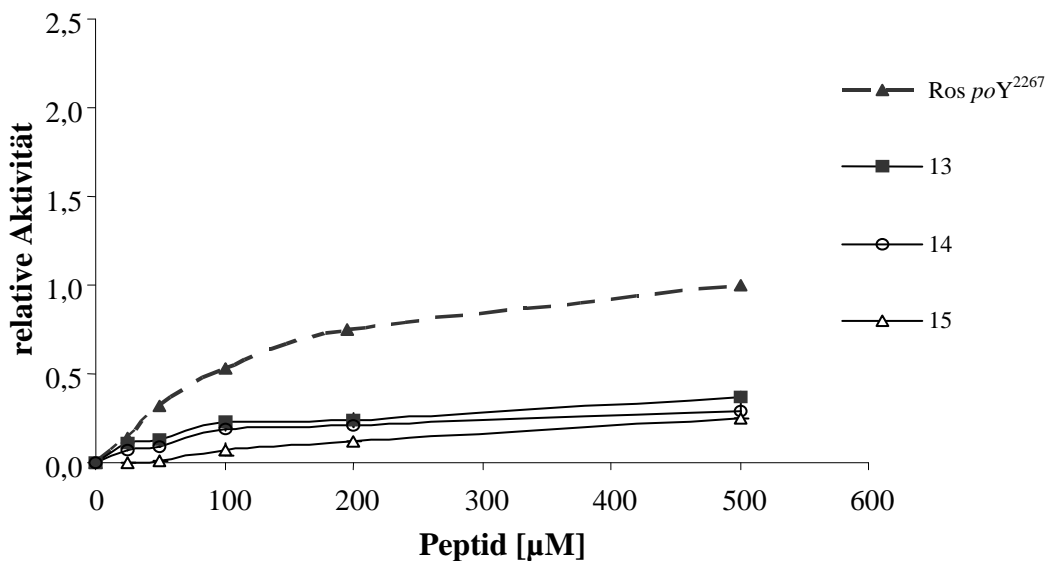


Abb. 13. Aktivierung von SHP-1 durch die cyclischen Phosphopeptide 13, 14, 15 im Vergleich zu Ros poY^{2267} [176].

Die Stimulierung der SHP-1-Aktivität (15 nM Endkonzentration) erfolgte unter Verwendung verschieden konzentrierter Peptidlösungen (0-500 μM) und pNPP (10 mM, Reaktionszeit 30 min). Die Menge des entstandenen p-Nitrophenolat-Anions wurde bei 405 nm bestimmt und relativ zur Absorption von Ros poY^{2267} bei 500 μM angegeben.

Zusammenfassung der Ergebnisse der ersten Serie von cyclischen Phosphopeptidliganden:

- 1.) Durch die Einführung eines Cyclus in die Ros poY^{2267} -Sequenz wurden nur gering aktivierende Liganden (max. Aktivierung der Phosphatase < 0,4) generiert. In weiteren Untersuchungen musste nun geklärt werden, ob diese Sequenzen als Inhibitoren fungieren oder die fehlende Aktivierung auf der nicht vorhandenen Interaktion mit der N-SH2-Domäne beruht (siehe 3.2.2.2).
- 2.) Da für die linearen Phosphopeptide eine Modifikation in $poY+1$ und in $poY+3$ zu stärker aktivierenden Liganden geführt hat, soll die biologische Aktivität von Peptiden mit Variationen innerhalb dieser Positionen durch die ermittelten optimalen Aminosäuren bestimmt werden.

Zweite Serie von Liganden

Obwohl kaum Unterschiede zwischen Peptid **13** und **14** im Phosphataseaktivitätstests detektiert wurden, zeigte der Ligand **13** eine stärkere Affinität für die N-SH2-Domäne (siehe 5.3.2.1.). Aufgrund dieser Präferenz wurden die Variationen in *poY+1* und *poY+3* nur in der Sequenz des Liganden **13** durchgeführt. Durch den Einbau von Nle und Phe in *poY+1* und Hfe in *poY+3* wurden stark aktivierende cyclische Liganden (Peptide **18** und **19**) generiert. Obwohl für die halbmaximale Aktivierung der Phosphatase verglichen mit den linearen Peptiden gleicher Sequenz (Peptid **16** und **17**) ähnliche Konzentrationen nötig waren, konnten diese Peptide eine deutlich stärkere maximale Aktivität von SHP-1 auslösen. Die Fixierung des Peptidrückgrates des Liganden stabilisiert die Konformation des Liganden wahrscheinlich so, dass die Seitenketten der Aminosäuren in *poY+1* und *poY+3* ideal mit den Bindungstaschen interagieren können. Im Vergleich der Peptidliganden untereinander erzielte sowohl innerhalb der linearen als auch unter den cyclischen Liganden die Peptidsequenz mit Phe in Position *poY+1* und Hfe in Position *poY+3* (Peptid **16** und **18**) die stärkste Aktivität im Hinblick auf die SHP-1 Stimulierung (Abb. 14).

In Peptid **21** wurde der Cyclus in die Sequenz des Konsensussequenz Klasse II-Liganden (Peptid **20**) eingebaut. Dieser Peptidligand stimulierte die Aktivität von SHP-1 vergleichbar wie die Leitstruktur Ros *poY*²²⁶⁷. Die Sequenz von Peptid **21** unterscheidet sich nur in Position *poY+1* von der des Peptides **13**. Demnach wird Ala besser als Met in Position *poY+1* gebunden. Im Vergleich zu dem linearen Peptid der Konsensussequenz Klasse II (Peptid **20**) kann durch die Stabilisierung der Konformation ein stärker aktivierender Ligand generiert werden (Abb. 14).

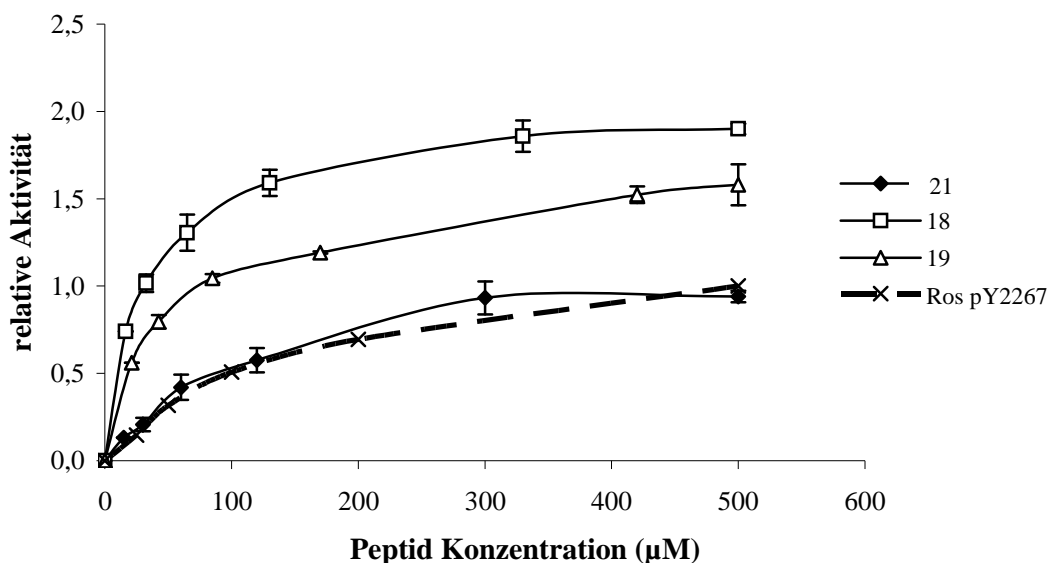


Abb. 14. Stimulation der Phosphataseaktivität durch cyclische Liganden der zweiten Serie [183].

Die Stimulierung der SHP-1-Aktivität (15 nM Endkonzentration) erfolgte unter Verwendung verschieden konzentrierter Peptidlösungen (0-500 µM) und pNPP (10 mM, Reaktionszeit 30 min). Die Menge des entstandenen p-Nitrophenolat-Anions wurde bei 405 nm bestimmt und relativ zur Absorption von Ros *poY*²²⁶⁷ bei 500 µM angegeben.

5.3.2. Bindungsstudien

Die Affinität der Phosphopeptidliganden für die N-SH2-Domäne wurde mittels Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR) bestimmt. Mit Hilfe dieser Methode können biomolekulare Interaktionen in Echtzeit detektiert werden. Trifft polarisiertes Licht durch ein Medium mit einer hohen optischen Dichte (Glas) auf eine Grenzfläche, wird es, wenn der Einfallswinkel größer als der kritische Winkel ist, total reflektiert. Ein Teil des Lichtes gelangt durch die Grenzfläche in das Medium mit der niedrigeren optischen Dichte (Puffer) und interagiert mit den freien oszillierenden Elektronen der Goldoberfläche (Plasmonen). Dies führt zu einem Abfall der Lichtintensität. Die Änderung der Lichtintensität und des Resonanzwinkels, welche von der Konzentration an Molekülen auf der Oberfläche abhängig ist, wird gemessen und in resonance units (RU) angegeben [190].

Basis dieser Technologie ist die Immobilisierung eines Interaktionspartners (Ligand) auf einem Sensorchip. Nach Injektion steigender Konzentration des zweiten Partners (Analyt) über den Sensorchip kann sowohl die Bindungskinetik als auch die Affinität des Liganden anhand von Änderungen im optischen Signal ermittelt werden [190].

Als Liganden dienten die biotinylierten Phosphopeptide, die auf je einer Flusszelle des Streptavidin-beschichteten Sensorchips immobilisiert wurden. Um die Flexibilität des Liganden nicht zu behindern, wurde zwischen der Peptidsequenz und dem für die Immobilisierung benötigten Biotin ein Linker aus 8-Amino-3,6-dioxaoktansäure (Ado) eingebaut.

Die N-SH2-Domäne wurde als GST-Fusionsprotein aufgereinigt und als Analyt über die Chipoberfläche geleitet. Aufgrund der Sensitivität dieser Messungen ist die Proteinqualität eine entscheidende Determinante. Da GST-Fusionsproteine in Lösung zur Dimerisierung neigen und Dimere sowohl die Affinität als auch die Bindungskinetik beeinflussen können, wurde direkt vor jeder Biacore-Messung der dimere Anteil des Proteins über eine Gelfiltration abgetrennt. Um weiterhin die Möglichkeit einer Interaktion des eventuell unvollständig entfernten dimeren Proteins zu verhindern, wurden nur geringe Konzentrationen des Liganden immobilisiert. So kann eine simultane Bindung des dimeren Analyten an zwei benachbarte Phosphopeptide unterbunden werden [191-193].

5.3.2.1. Affinität der linearen Phosphopeptide für die GST-N-SH2-Domäne

Erste Serie von linearen Liganden

Nach Auswertung des Sensogramms (Abb. 15) durch die BIAevaluation-Software 3.0 wurde für die Leitstruktur Ros *poY*²²⁶⁷ ein K_D -Wert von $1,44 \pm 0,45 \mu\text{M}$ ermittelt (Tab. 10). In

früheren Studien wurde für ein Phosphopeptid der Ros poY^{2267} -Sequenz ein deutlich niedrigerer K_D -Wert ($0,18 \mu\text{M} \pm 0,05 \mu\text{M}$) bestimmt [194]. Es handelte sich jedoch dabei um eine längere Sequenz von Ros poY^{2267} , bestehend aus 12 Aminosäuren im Vergleich zu dem Oktapeptid dieser Studie. Eine Verlängerung der Sequenz kann positiv zur Stabilisierung der Bindung über zusätzliche Interaktionen beitragen. Wie kürzlich berichtet wurde, üben besonders die Positionen $poY+4$ bis $poY+6$ einen entscheidenden Einfluss auf die Affinität für die SH2-Domänen von SHP-1 und SHP-2 aus [137]. Vergleiche zwischen Dissoziationskonstanten verschiedener Studien sollten deshalb nur für Peptidsequenzen gleicher Länge vorgenommen werden. Für andere Oktapeptide ähnlicher Sequenz wurden K_D -Werte im gleichen Konzentrationsbereich beschrieben [136, 141].

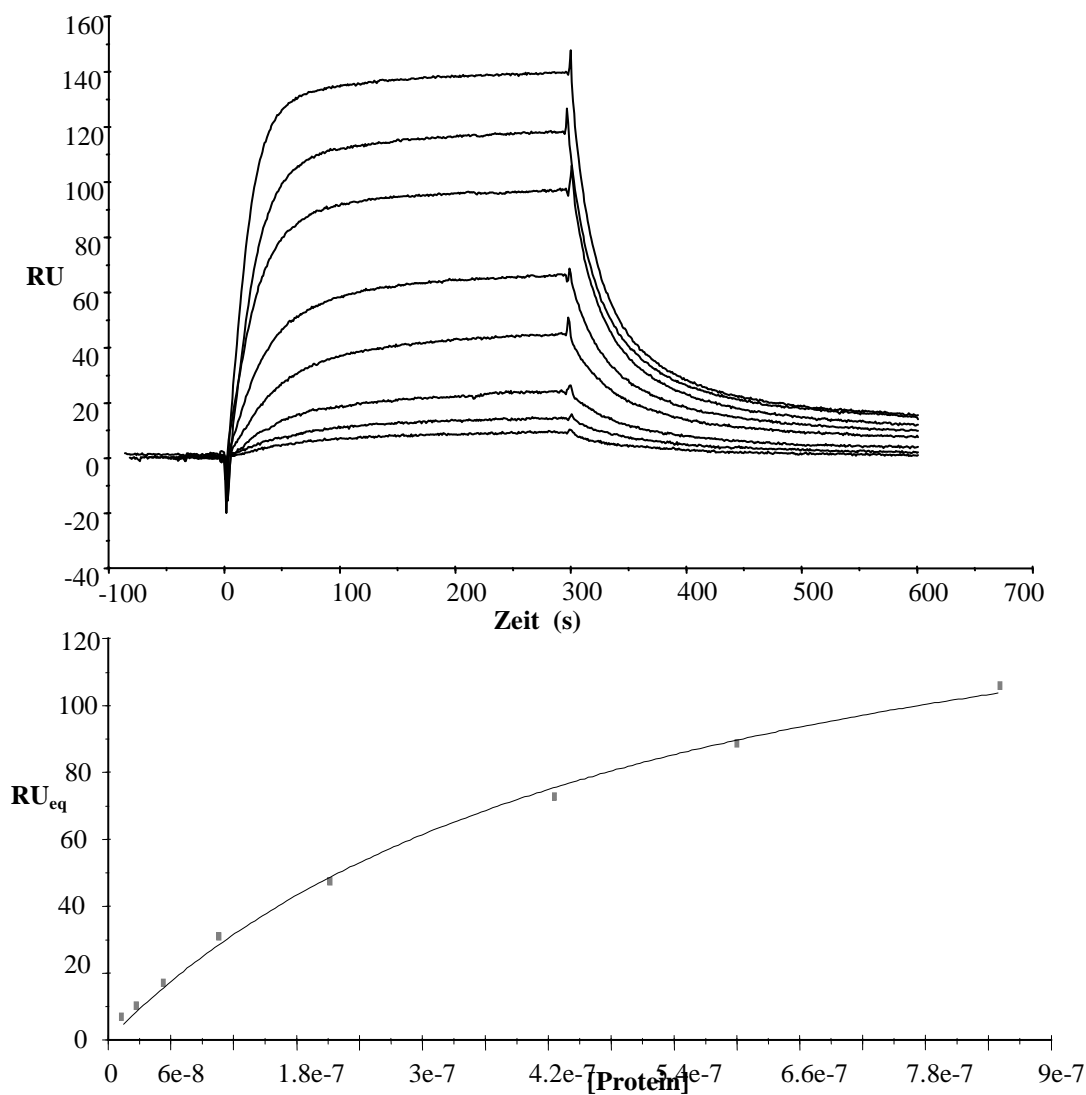


Abb. 15. Sensogramm der Bindung von Ros poY^{2267} an die GST-N-SH2-Domäne von SHP-1 [183].

Bild oben: Es wurden steigende Konzentrationen (0-1000 nM) des Analyten (GST-N-SH2-Domäne) über den Sensorchip geleitet. Die Assoziations- und Dissoziationszeit betrug 300 sec. Die Auswertung erfolgte mit der BIAevaluation Software 3.0 unter Einbeziehung der Assoziations- (k_{on}) und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{off}) ($K_D = k_{off}/k_{on}$, *Seperate fit*) (Tab. 10).

Bild unten: Die SPR-Signale im Gleichgewicht (RU_{eq}) wurden gegen die Proteinkonzentration aufgetragen. Die Auswertung erfolgte mit dem *steady state*-Modell der BIAevaluation Software 3.0 (Tab. 10).

Die linearen Phosphopeptidsequenzen, die im Phosphataseaktivitätstest SHP-1 stärker als der natürliche Ligand Ros poY^{2267} stimulierten, wiesen auch eine erhöhte Affinität für die GST-N-SH2-Domäne auf. Für die Peptide **9** und **10**, welche in Position $poY+1$ Nle bzw. Phe und in $poY+3$ Phe enthalten, wurden im Vergleich zur Leitstruktur ungefähr 6-10-fach niedrigere K_D -Werte ermittelt (Tab. 10).

Auch die Peptidliganden mit konformationsstabilisierenden nichtproteinogenen Aminosäuren zeigten teilweise höhere Affinitäten. So führt der Einbau von Hfe in $poY+3$ zu einem stärker bindenden Liganden verglichen mit der gleichen Modifikation der Ros poY^{2267} -Sequenz in $poY+1$ (Tab. 10).

Die Ergebnisse des Dockings der Peptide **5c**, **5d**, **6b**, **7b** und **8b** in die N-SH2-Domäne wurden durch die Biacore-Messungen bestätigt. Aufgrund der enthaltenen D-Form der nichtproteinogenen Aminosäuren Abu(β Ph) und Ser(β Ph) können diese Liganden nicht an die GST-N-SH2-Domäne binden. Zwischen den *erythro*- und *threo*-Formen von Abu(β Ph) wurden nur minimale Unterschiede festgestellt (Tab. 10).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Einbau von Nle/Phe/L-Abu(β Ph) in $poY+1$ und Phe/Hfe/L-Abu(β Ph)/L-Ser(β Ph) die Bindungseigenschaften des Ros poY^{2267} -Liganden positiv beeinflusst.

Zweite Serie von linearen Liganden

Es sollte nun geprüft werden, ob die stärkere Aktivierung der Phosphatase durch die Liganden der zweiten Serie auf eine intensivere Bindung mit der N-SH2-Domäne zurückzuführen ist.

Beide Phosphopeptide (Peptide **16** und **17**) stellen hochaffine Bindungspartner für die GST-N-SH2-Domäne dar. Die ermittelten Dissoziationskonstanten liegen etwa eine Zehnerpotenz niedriger als der K_D -Wert der Leitstruktur, nahe dem Bereich der stärksten Interaktionspartner der ersten Serie.

Der mit der Konsensussequenz Klasse II korrespondierende Ligand zeigte eine stärkere Bindung an die GST-N-SH2-Domäne als Ros poY^{2267} . Wahrscheinlich kann die im Vergleich zur Leitstruktur kürzere Seitenkette der Aminosäure in Peptid **20** (Met vs. Ala) leichter in die $poY+1$ -Bindungstasche eingelagert werden.

5.3.2.2. Affinität der cyclischen Phosphopeptide für die GST-N-SH2-Domäne

Erste Serie von cyclischen Liganden

Die Peptide **13** und **14**, die im Phosphataseaktivitätstest eine geringe Aktivität zeigten, wiesen eine hohe Affinität für die GST-N-SH2-Domäne auf. Die K_D -Werte dieser Peptide liegen mit $0,11 \pm 0,01 \mu\text{M}$ (Peptid **13**) und $0,21 \pm 0,07 \mu\text{M}$ (Peptid **14**) im gleichen Konzentrationsbereich wie die der hoch affinen linearen Peptide **9** und **10**. Dies bestärkt die Vermutung, dass diese Liganden als Inhibitoren wirken könnten. Der Einfluss des Cyclus im Peptid **15** auf die Peptidkonformation wurde in der Modellierung als negativ bewertet. Wahrscheinlich ist eine Ausbildung der zur Bindung benötigten gestreckten Konformation nicht möglich. Durch die Biacore-Bindungsstudien wurde dies bestätigt. So konnte keine Bindung zwischen Peptid und GST-N-SH2-Domäne festgestellt werden (Tab. 10).

Zweite Serie von cyclischen Liganden

Der Einbau der optimalen Aminosäuren in die Sequenz des Peptides **13** führte zu hoch affinen Liganden. Sowohl für Peptid **18** als auch für Peptid **19** wurden die niedrigsten K_D -Werte, im Konzentrationsbereich etwa 20-fach niedriger als Ros *poY*²²⁶⁷, der gesamten Studie bestimmt (Abb. 16, Tab. 10). Die hohe Affinität dieser Liganden korreliert gut mit den Ergebnissen des Phosphataseaktivitätstest dem diese Peptide auch die stärkste Stimulation von SHP-1 bewirkten.

Für das cyclische Peptid **21**, einen Vertreter der Konsensussequenz Klasse II, wurde zwar im Vergleich zur Leitstruktur ein geringerer K_D -Wert ermittelt, im Gegensatz zum linearen Pendant wurde jedoch keine Affinitätssteigerung erzielt. Die Fixierung des Peptidrückgrates erlaubt zwar ähnlich wie für Peptid **13** beschrieben eine Bindung des Leu in die *poY*+3 Bindungstasche, das kürzere Ala kann jedoch möglicherweise nicht mehr in die *poY*+1-Tasche eingelagert werden, was die Senkung der Affinität im Vergleich zu Peptid **20** begründet.

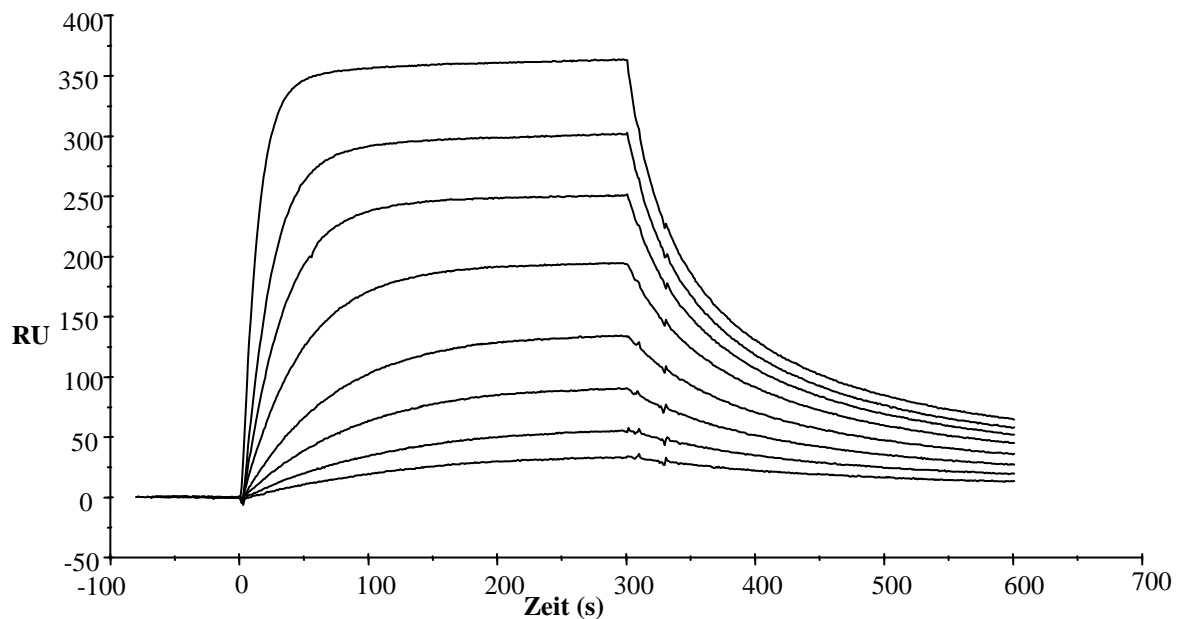


Abb. 16. Sensogramm der Bindung von Peptid 18 an die GST-N-SH2-Domäne von SHP-1.

Es wurden steigende Konzentrationen (0-1000 nM) von GST-N-SH2-Domäne injiziert. Die Assoziations- und Dissoziationszeit betrug 300 sec. Die Auswertung erfolgte mit der BIAevaluation Software 3.0 unter Einbeziehung der Assoziations- (k_{on}) und Dissoziationsrate (k_{off}) (*separate fit*) und des *steady state*-Modells (Tab. 10).

5.3.2.3. Affinität von Ros poY^{2267} für die N-SH2-Domäne

Wie erwähnt neigen GST-Fusionsproteine in Lösung zur Dimerisierung. Da die Änderung des SPR-Signals proportional dem Massezuwachs auf dem Sensorchip ist, würde bei Bindung eines dimeren Proteins ein, verglichen mit dem Monomeren, stärkeres Signal detektiert. Bei der Auswertung im *steady-state*-Modell und *Separate-fit* der BIAevaluation-Software 3.0 wird das 1:1 Modell von Langmuir [195] zugrunde gelegt. Eine Assoziation des teilweise dimerisierten Proteins würde jedoch einer Mischung aus 1:1- und 2:1-Bindung entsprechen und die Auswertung stark erschweren. Unter Verwendung des 1:1 Modells führt eine Auswertung von Bindungskurven mit teilweise dimerisiertem Protein zu einer Überbewertung der Affinität. So wurden z.B. im Vergleich zur isothermalen Titrationskalorimetrie (ITC), die die Bindung zweier Interaktionspartner in Lösung bestimmt, für gleiche Systeme mittels Biacore niedrigere K_D -Werte bestimmt. Bei Verwendung der freien SH2-Domäne stimmten die beiden Methoden jedoch gut überein [191]. In einer weiteren Messung sollte nun die Bindung zwischen der freien N-SH2-Domäne und der Leitstruktur Ros poY^{2267} charakterisiert werden. Gleichzeitig sollte auch untersucht werden, in welchem Umfang der Fusionspartner durch Einschränkung der Proteinkonformation die Kinetik der Bindung beeinflusst [193].

Der ermittelte K_D -Wert von $1,31 \pm 0,16 \mu\text{M}$ stimmt gut mit dem des GST-Fusionsproteins von $1,44 \pm 0,41 \mu\text{M}$ überein. Die Kinetik der Bindung ist jedoch verändert. Im Gegensatz

zum Fusionsprotein wurde für die freie SH2-Domäne eine höhere Assoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{on}) und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{off}) detektiert (Abb. 17 vs. Abb. 15). Vergleichende kinetische Konstanten können nicht angegeben werden, da eine Auswertung mittels *separate-fit* aufgrund der hohen Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeit (< 1 sec) für die freie N-SH2-Domäne nicht vorgenommen werden kann. Aufgrund der guten Übereinstimmung der K_D -Werte wird davon ausgegangen, dass im Falle des GST-Fusionsproteins die Affinität des monomeren Proteins bestimmt wurde.

Als essentiellen Schritt für die Verwendung von GST-fusionierten Proteinen in Biacore-Systemen hat sich die Aufreinigung der Proteindomäne mittels Gelfiltration direkt vor der Messung herausgestellt.

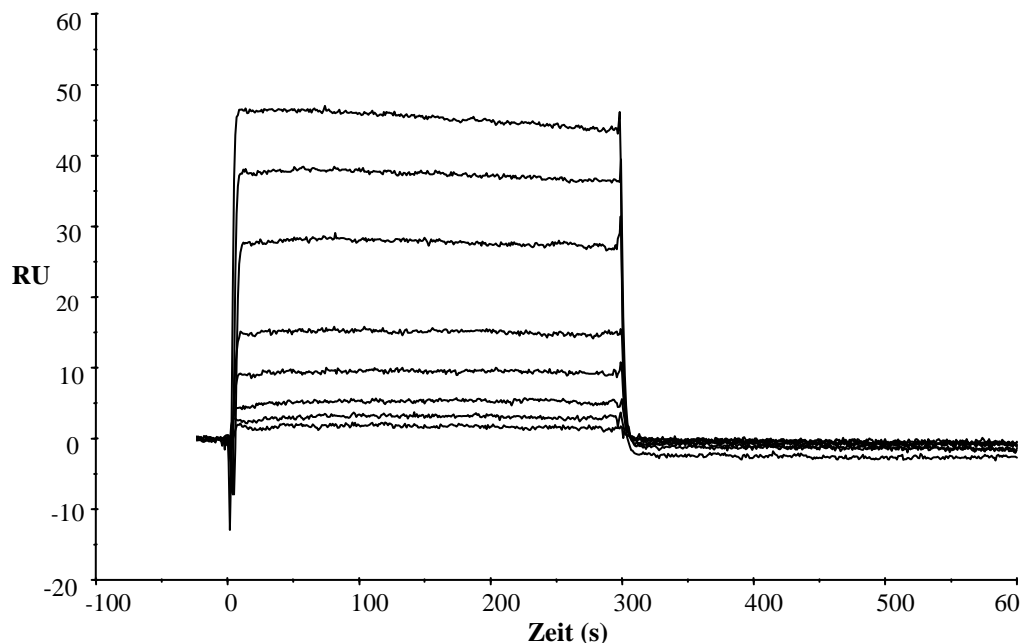


Abb. 17. Sensogramm der Bindung von Ros pOY^{2267} an die N-SH2-Domäne von SHP-1 [183].

Es wurden steigende Konzentrationen (0-1000 nM) von GST-N-SH2-Domäne injiziert. Die Assoziations- und Dissoziationszeit betrug 300 sec. Die RU-Level im Gleichgewicht (RU_{eq}) wurden anschließend gegen die Proteinkonzentration aufgetragen. Für die Bestimmung des K_D -Wertes konnte aufgrund der schnellen Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeit (< 1 sec) ausschließlich das *steady state*-Modell (BIAevaluation Software 3.0) benutzt werden (Tab. 10).

5.3.3. Konkurrenzexperimente

5.3.3.1. Cyclische Phosphopeptide als partielle Inhibitoren der Phosphataseaktivität

Die cyclischen Liganden **13** und **14** wiesen eine höhere Affinität für die GST-N-SH2-Domäne auf als die Leitstruktur Ros pOY^{2267} , konnten jedoch die Phosphataseaktivität nur gering stimulieren. Dies ließ die Vermutung zu, dass sie als Inhibitoren die SHP-1-Aktivierung

beeinflussen können. In einem Phosphataseaktivitätstest wurde deshalb die Fähigkeit dieser Liganden überprüft, die Aktivierung von SHP-1 durch Ros poY^{2267} kompetitiv zu inhibieren. Beide Peptide inhibierten die Ros poY^{2267} -vermittelte Aktivierung nur partiell. Während bei 25 μM und 50 μM eine Hemmung der SHP-1-Stimulation zu beobachten war, führten höhere Konzentrationen an cyclischen Peptiden teilweise zur zusätzlichen Aktivierung der Phosphatase (Abb. 18).

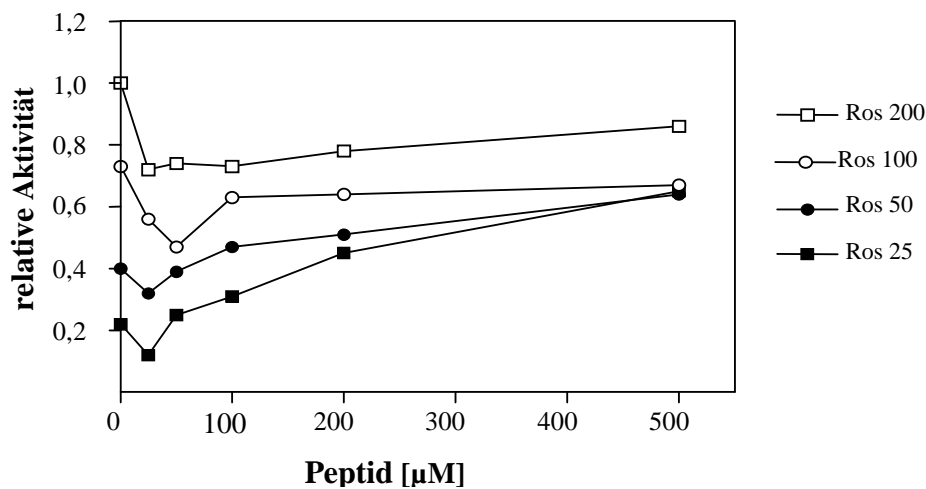


Abb. 18. Peptid 14 inhibiert partiell die Ros poY^{2267} -vermittelte SHP-1 Aktivierung [176].

Die Stimulierung der SHP-1-Aktivität (15 nM Endkonzentration) wurde nach gleichzeitiger Inkubation von steigenden Konzentrationen (0-500 μM) an Peptid 13 und 14 und konstanter Konzentration an Ros poY^{2267} mit pNPP (10 mM) bestimmt (Reaktionszeit 30 min). Die Menge des entstandenen p-Nitrophenolat-Anions bei 405 nm wurde relativ zur Absorption von Ros poY^{2267} bei 500 μM angegeben.

Es galt nun zu testen, ob die zusätzlichen aktivierenden Effekte auf eine Interaktion der Peptidliganden mit der C-SH2-Domäne zurückzuführen sind oder ob die Bindung an die N-SH2-Domäne die Inhibierung auslöst. In einem Phosphataseaktivitätsassay mit einem SHP-1 R32K-Konstrukt, welches eine Punktmutation in der N-SH2-Domäne enthält, wurde die Fähigkeit, die Phosphatase über die C-SH2-Domäne zu stimulieren, bestimmt. Alle drei Peptidliganden (Peptid 13, Peptid 14 und Ros poY^{2267}) konnten SHP-1 R32K verglichen mit dem wtSHP-1 nur sehr gering aktivieren. Signifikante Unterschiede zwischen den cyclischen Liganden 13 und 14 und der Leitstruktur wurden nicht festgestellt (Abb. 19).

Es ist deshalb unwahrscheinlich, dass die Aktivierung im kompetitiven Phosphataseaktivitätsassay auf die Interaktion mit der C-SH2-Domäne zurückzuführen ist.

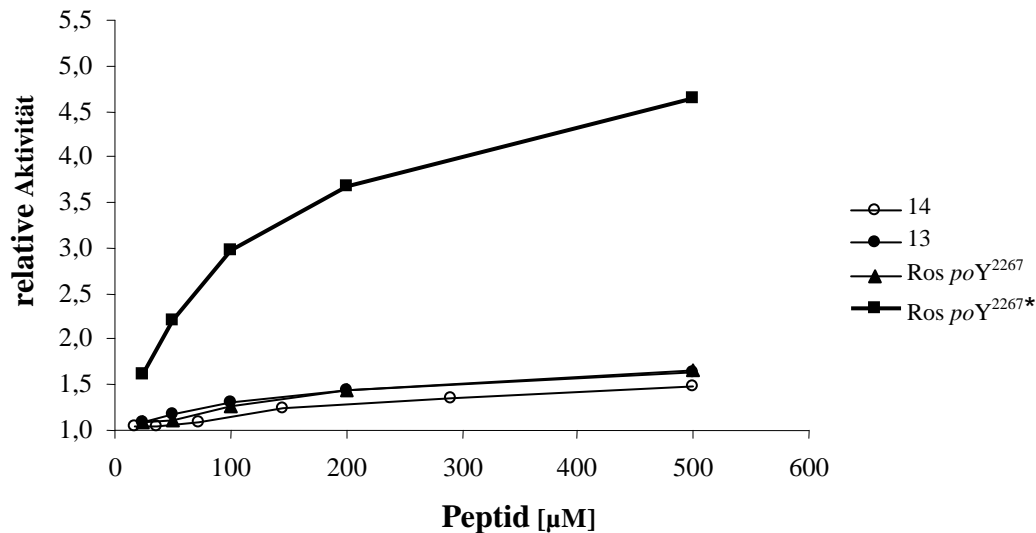


Abb. 19. Stimulierung von SHP-1 (Ros *pOY*^{2267*}) und SHP-1 R32K durch Ros *pOY*²²⁶⁷, Peptid 13 und 14 [183].

Die Stimulierung der SHP-1- und SHP-1-R32K-Aktivität (15 nM Endkonzentration) erfolgte unter Verwendung verschieden konzentrierter Peptidlösungen (0-500 μM) und pNPP (10 mM, Reaktionszeit 30 min). Die Menge des entstandenen p-Nitrophenolat-Anions wurde bei 405 nm bestimmt und relativ zur Basalaktivität von SHP-1 (ohne Peptid) angegeben. Die Stimulierung durch Ros *pOY*^{2267*} wurde mit wtSHP-1 durchgeführt. Die Kurven Ros *pOY*²²⁶⁷, 13 und 14 entsprechen der Aktivierung von SHP-1-R32K.

5.3.3.2. Kompetitive Bindung der cyclischen Phosphopeptide zu Ros *pOY*²²⁶⁷

Um zu prüfen, ob die cyclischen Liganden 13 und 14 dieselbe Bindungsstelle wie Ros *pOY*²²⁶⁷ innerhalb der N-SH2-Domäne nutzen, wurde ein kompetitiver Biacore-Assay durchgeführt.

Dafür wurde die GST-N-SH2-Domäne (1 μM) mit steigenden Konzentrationen an cyclischem Peptid (13 und 14) versetzt. Nach 15 min wurde der Inkubationsansatz über den Sensorchip geleitet und die Inhibierung der Assoziation zwischen der GST-N-SH2-Domäne und dem immobilisierten Ros *pOY*²²⁶⁷ bestimmt. Wie in Abb. 20 ersichtlich, konnten beide Liganden die Bindung kompetitiv inhibieren. So führten steigende Konzentrationen cyclischer Peptide zu einer Reduzierung des Biacore-Signals (RU_{eq}). Beide Liganden (13, 14) können im Vergleich zu Ros *pOY*²²⁶⁷ selbst die Assoziation zwischen Ros *pOY*²²⁶⁷ und der GST-N-SH2-Domäne stärker hemmen. So wurden nach Auswertung der Kurven mit der GraphPadPrism Software 2.0 für die Peptide 13 und 14 niedrigere IC_{50} -Werte ermittelt. Dies bestätigt die Ergebnisse der Bindungsstudien, in denen beide Peptide eine höhere Affinität als Ros *pOY*²²⁶⁷ für die GST-N-SH2-Domäne aufweisen. Erneut ist die Bindungsstärke des Peptides 13 im Vergleich zu Peptid 14 höher.

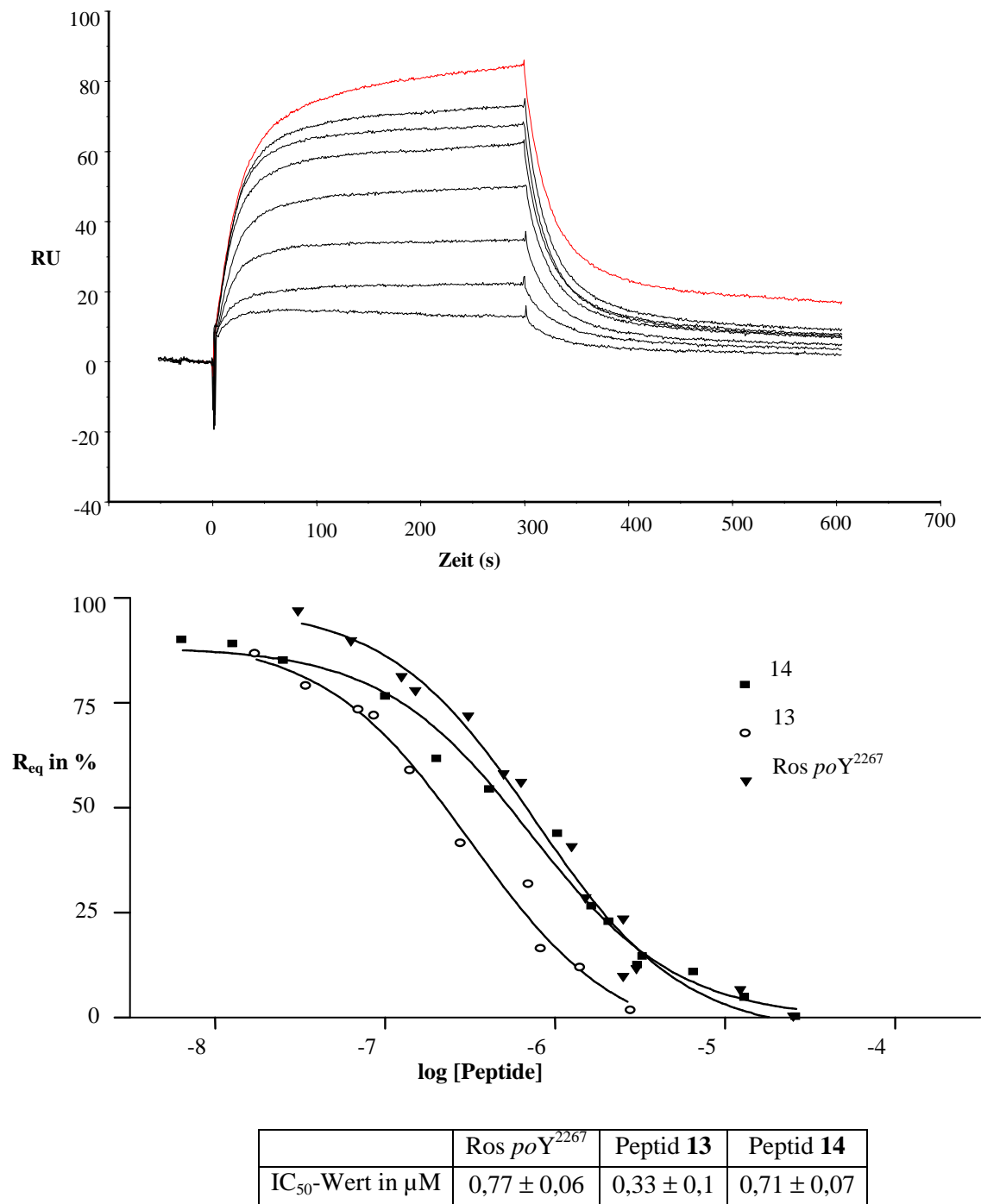


Abb. 20. Die cyclischen Peptide 13 und 14 binden kompetitiv zu Ros *poY*²²⁶⁷ an die GST-N-SH2-Domäne [183]. Bild oben: Nach Injektion von 1 μM GST-N-SH2-Domäne über eine mit Ros *poY*²²⁶⁷ immobilisierte Flusszelle (rote Kurve) wurden anschließend steigende Konzentrationen an Peptid (13, 14 und Ros *poY*²²⁶⁷) mit der GST-N-SH2-Domäne (1 μM) vorinkubiert (15 min) und erneut über den Sensorchip geleitet (schwarze Kurven). Bild unten: Die R_{eq} -Level wurden gegen die Konzentration des konkurrierenden Peptids aufgetragen. Zur Bestimmung der IC₅₀-Werte wurden die Kurven mittels GraphPadPrism Software 2.0 (*one site competition*-Modell) ausgewertet.

5.3.3.3. Theoretische Studien zur Ermittlung des Bindungsmodus ausgewählter Liganden

Wie in Kapitel 5.1 beschrieben, dienten Molekülmodellierungsstudien der Vorauswahl von Liganden, die aufgrund ihrer Passfähigkeit mit der N-SH2-Domäne interagieren sollten. Die Ergebnisse der experimentellen Untersuchungen (Phosphataseaktivitätstest und Bindungsstudien) bestätigten das theoretische Ranking, das für die Peptide **1 - 15** der ersten Serie erstellt wurde [176]. Diese Arbeiten bildeten die Grundlage für die Auswahl der Liganden der zweiten Serie, für die aufgrund dieser Erkenntnisse im Vorfeld der Synthese und Testung keine theoretischen Untersuchungen zur Passfähigkeit unternommen wurden. Besonders interessant im Hinblick auf die Inhibierung von SHP-1 waren jedoch die experimentellen Ergebnisse für die cyclischen Peptide **13** und **14** gegenüber denen der zweiten Serie **18, 19** und **21**. Um Unterschiede bezüglich der Assoziation dieser Liganden an die N-SH2-Domäne zu finden und darüber deren gegensätzliche Aktivitäten zu erklären, wurden die Peptide in die überlagerten Kristallstrukturen der komplexierten (PDGF *poY*⁷⁴⁰) N-SH2-Domäne von SHP-2 (PDB1AYA) und der des vollständigen Enzyms (PDB2SHP) eingepasst (Abb. 21). Die Überlagerung beider Domänen ergab, dass eine Konformationsänderung der Schleife zwischen dem β 5 und β 6-Motiv (Aminosäuren 62-68) möglicherweise bei der Dissoziation der PTP- und N-SH2-Domäne eine Rolle spielt (Abb. 21A). Anhand des Dockings der Peptide **13, 14, 16, 17, 18, 19, 20** und **21** sollte nun überprüft werden, wie sich die Position dieser Schleife nach Bindung der Liganden verändert [183].

Es konnten zwei verschiedene Bindungsmodi unterschieden werden. Es wird angenommen, u.a. dass die Lage der Aminosäure in *poY*+3 über Aktivierung und Inhibierung der Phosphatase entscheidet. Die Leitstruktur Ros *poY*²²⁶⁷ bindet im Bindungsmodus Klasse II. Die gestreckte Konformation des Liganden und der *poY*+3-Rest, positionieren die N-SH2-Domäne so, dass eine fortführende Interaktion zwischen N-SH2-Domäne und PTP-Domäne nicht mehr möglich ist. Die Bindung in diesem Modus führt deshalb immer zur Aktivierung der Phosphatase (Abb. 21B/C).

Dagegen findet eine Assoziation zwischen den cyclischen Peptiden **13** und **14** an die N-SH2-Domäne im Bindungsmodus Klasse I statt. Der Ligand wird in einer gekrümmten Konformation eingelagert. Dies lässt dem *poY*+3-Rest einen größeren Freiraum in der Bindung. Eine Dissoziation des N-SH2-PTP-Komplexes findet nur statt, wenn der *poY*+3-Rest tief genug in die Bindungstasche eintaucht. Im Fall der Peptide **13** und **14** ist das Leu wahrscheinlich zu kurz, um eine vollständige Aktivierung auszulösen. Die Peptide **18** und **19** dagegen können durch den aromatischen Hfe-Rest gut mit den Resten der Tasche interagieren und führen zur

Aktivierung der Phosphatase. Auch die linearen Pendants (Peptide **16** und **17**) binden im Klasse I-Modus, da die langen und sperrigen Seitenketten der Aminosäuren in $pOY+1$ und $pOY+3$ keine gestreckte Konformation des Liganden zulassen (Abb. 21D/E).

Beide Peptide der Konsensussequenz Klasse II (Peptide **20** und **21**) binden in gestreckter Konformation (Bindungsmodus II). Da sowohl in $pOY+1$ als auch in $pOY+3$ kurze Aminosäuren eingebaut wurden, können die Bindungstaschen auch nach Cyclisierung ideal eingelagert werden. Der Leu-Rest in $pOY+3$ drückt die N-SH2-Domäne aus der Assoziation mit der PTP-Domäne heraus und führt zur Aktivierung der Phosphatase. Die Flexibilität des Peptides **21** ist jedoch eingeschränkt. Dies erschwert die Ausbildung der benötigten gestreckten Konformation. Diese Hypothese wird durch die Bindungsstudien unterstützt, in denen für Peptid **21** eine niedrigere Affinität im Vergleich zum Peptid **20** bestimmt wurde.

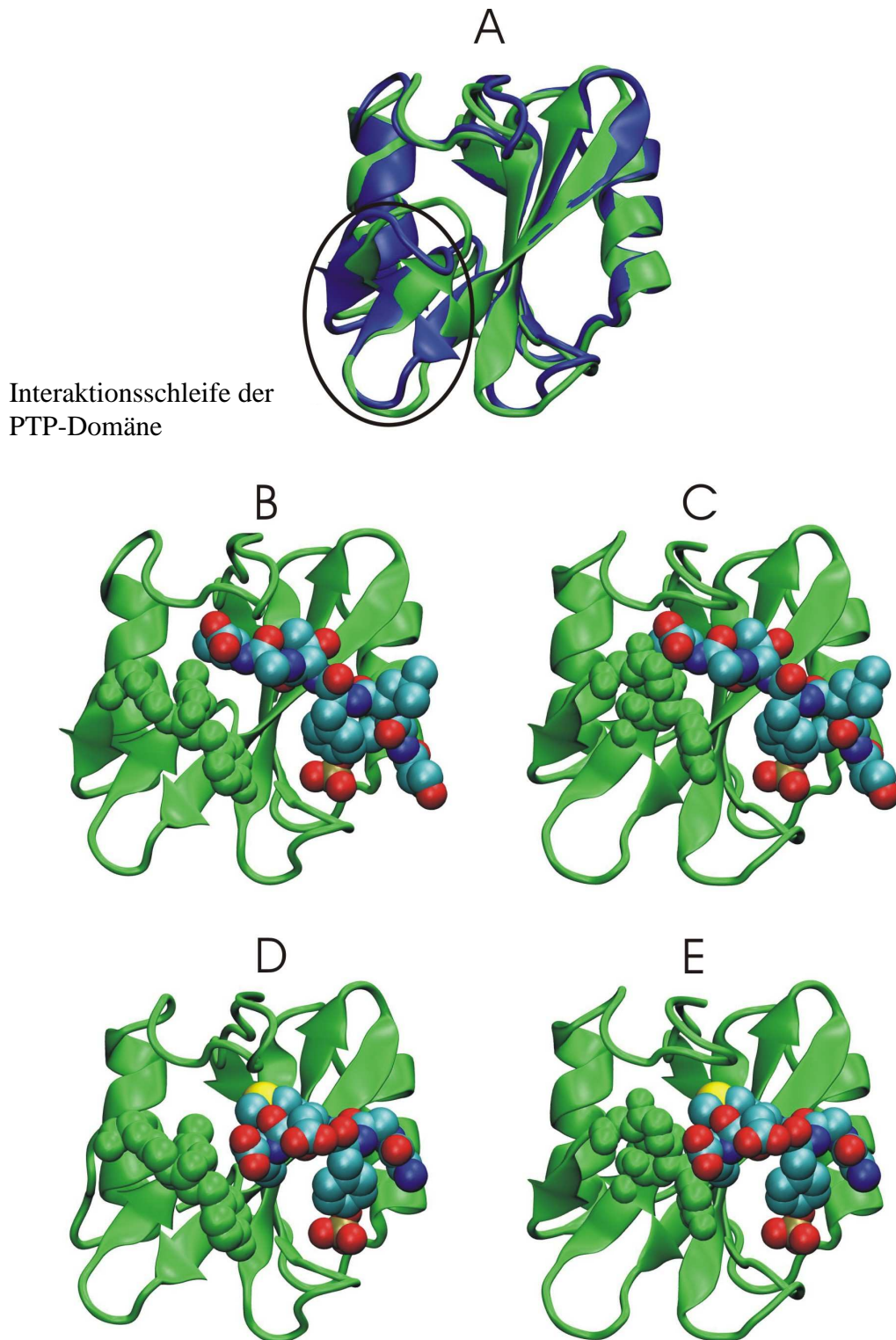


Abb. 21. Peptidliganden binden in verschiedenen Bindungsmodi an die N-SH2-Domäne [183].

(A) Superpositionierung der N-SH2-Domäne von SHP-2 in der Peptid-gebundenen Form (blau, PDB1A5A) und in der freien Form (grün, PDB2SHP). Die Konformation der freien N-SH2-Domäne entspricht der des inaktiven Proteins (SHP-2). Die Schleifenregion innerhalb der N-SH2-Domäne, welche mit der PTP-Domäne interagiert, ist dargestellt. (b) Peptid bindet im Bindungsmodus II. Dargestellt ist die N-SH2-Domäne nach Peptidbindung. (c) Peptid wird im Bindungsmodus II in der freien N-SH2-Domäne des inaktiven Proteins eingelagert. (d) Peptid bindet im Bindungsmodus I. Dargestellt ist die N-SH2-Domäne nach Peptidbindung. (e) Peptid wird im Bindungsmodus I in die freie N-SH2-Domäne des inaktiven Proteins eingelagert.

5.4. Weitere Untersuchungen zur Regulation der Enzymaktivität mit ausgewählten

Liganden

Beide SH2-Domänen weisen neben spezifischen Selektivitäten auch Übereinstimmungen in ihren Konsensussequenzen auf [136, 141].

Es liegt deshalb nahe, dass die für die N-SH2-Domäne optimierten Peptidliganden auch an die C-SH2-Domäne binden können. Im Phosphataseaktivitätstest (siehe 5.3.1.) wurde jedoch nicht unterschieden, welche SH2-Domänen-Interaktion zur Aktivierung von SHP-1 führt. Nicht auszuschließen ist ebenfalls die simultane Bindung zweier Phosphopeptide an beide SH2-Domänen. In einem erneuten Phosphataseaktivitätstest mit ausgewählten Peptiden sollte deshalb durch Verwendung von SHP-1-Konstrukten mit inaktiver N-SH2-, C-SH2- oder Tandem-SH2-Domäne eine Unterscheidung vorgenommen werden.

Die dafür verwendeten SHP-1-Konstrukte enthielten eine Substitution des innerhalb der SH2-Domänen hoch konservierten Arg-Rest in Position β B5 zu Lys. In der epithelialen Variante von SHP-1 sind diese Arg-Reste in Position 32 (N-SH2-Domäne) und 138 (C-SH2-Domäne) lokalisiert [100]. Zur Testung wurden nur die stark aktivierenden Liganden **1**, **4**, **9** und **10** sowie die cyclischen Peptide **13** und **14** der ersten Serie und alle Liganden der zweiten Serie (**16**, **17**, **18**, **19**, **20**, **21**) ausgewählt.

5.4.1. Stimulation von SHP-1 über die N-SH2-Domäne

Verglichen zu wtSHP-1 war die maximale Aktivierung des SHP-1-Konstruktes mit inaktiver C-SH2-Domäne (R138K-Konstrukt) ausgelöst durch Ros *poY*²²⁶⁷ (500 μ M) nur leicht reduziert (5,1-fache vs. 4,3-fache Aktivierung der Phosphatase, Abb. 22). Auch für alle anderen Peptidliganden wurde eine geringere Maximalaktivität für SHP-1-R138K festgestellt. Im Vergleich der Peptide untereinander zeigte sich dasselbe Muster. So konnten alle Phosphopeptide, die eine im Vergleich zu Ros *poY*²²⁶⁷ stärkere Aktivierung von wtSHP-1 auslösen, auch SHP-1 R138K besser aktivieren (Abb. 21). Die Peptide **18** und **19** waren erneut die besten Aktivatoren. So konnte z.B. Peptid **18** eine maximale Aktivierung von SHP-1 R138K um das 7,4-fache auslösen. Die linearen Peptide **10**, **16** und **17** aktivierten SHP-1-R138K nur bis 100 μ M bzw. 200 μ M. Ähnlich wie bei wtSHP-1 führten höhere Peptidkonzentrationen zur Inhibierung der Phosphataseaktivität. Die Peptide **13** und **14** konnten SHP-1-R138K nur gering aktivieren. So wurde die Phosphataseaktivität durch Zugabe der Peptide nur um das 2-fache stimuliert (Abb. 22).

5.4.2. Stimulation von SHP-1 über die C-SH2-Domäne

Die Interaktion der Phosphopeptide mit der C-SH2-Domäne führt nur zu einer sehr geringen Aktivierung der Phosphatase (Abb. 22). Verglichen mit wtSHP-1 konnte Ros *poY*²²⁶⁷ die Phosphataseaktivität von SHP-1 mit inaktiver N-SH2-Domäne (SHP-1-R32K) nur zu 35% stimulieren (5,1-fache vs. 1,7-fache Stimulierung). Wie schon in 5.3.1.1. beschrieben, konnten die cyclischen Peptide **13** und **14** die Phosphatase ähnlich wie Ros *poY*²²⁶⁷ aktivieren. Erneut wurden die Peptidliganden **18** und **19** als stärkste Aktivatoren identifiziert, die beiden linearen Peptide **16** und **17** lösten ab Konzentrationen von 100 μ M bzw. 200 μ M eine Inhibierung der Phosphataseaktivität aus. Obwohl die beiden Liganden **20** und **21**, die der Konsensussequenz Klasse II entsprechen, aufgrund ihrer Sequenz auch als gute Interaktionspartner für die C-SH2-Domäne fungieren können, wurde eine geringere Aktivierung von SHP-1 über die C-SH2-Domäne im Vergleich zu Ros *poY*²²⁶⁷ detektiert.

Eine effiziente Aktivierung eines SHP-1-Konstruktes mit Mutationen in beiden SH2-Domänen (SHP-1-R32/138K) ist nicht möglich. Im Vergleich zum Wildtyp wird eine maximale Aktivierung der Doppelmutante durch Ros *poY*²²⁶⁷ bis maximal 30% erreicht (5,1-fache vs. 1,5-fache Stimulierung). Auch alle anderen Peptidliganden stimulierten SHP-1-R32/138K nur um das 1,1 - 1,5-fache (Abb. 22).

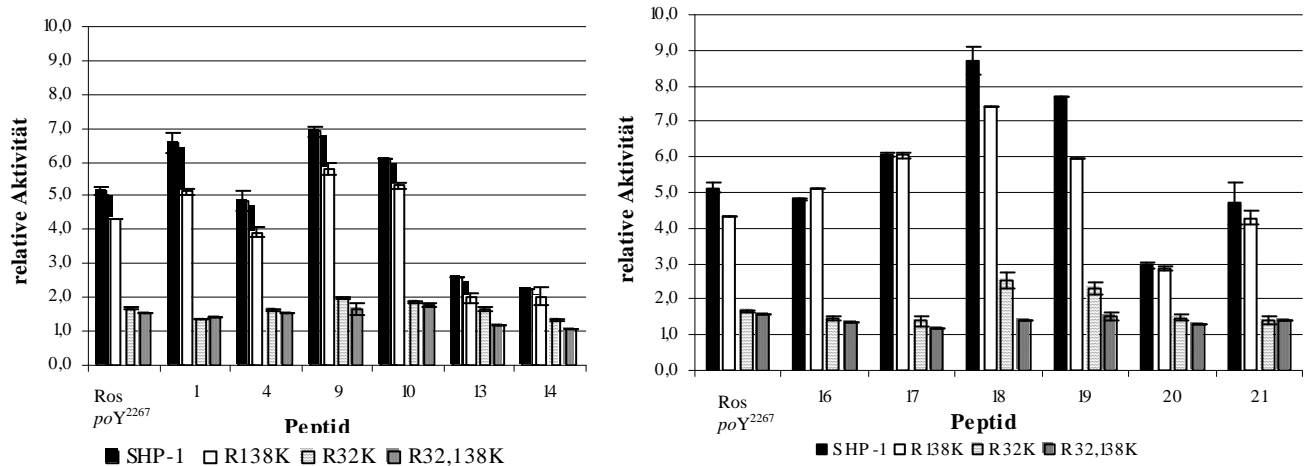


Abb. 22. Aktivierung von wtSHP-1 und verschiedenen SHP-1-Konstrukten (R32K, R138K, R32/138K) durch Phosphopeptide [183].

Die maximale Stimulierung der SHP-1-Aktivität (15 nM Endkonzentration) erfolgte unter Verwendung von Phosphopeptiden (500 μ M) und pNPP (10 mM, Reaktionszeit 30 min). Die Menge des entstandenen p-Nitrophenolat-Anions wurde bei 405 nm bestimmt und relativ zur Basalaktivität (ohne Peptid) angegeben.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass eine effiziente Aktivierung eine Bindung der Phosphopeptide an die N-SH2-Domäne voraussetzt. Eine mögliche Interaktion der

monophosphorylierten Peptide mit der C-SH2-Domäne spielt im Aktivierungsprozess nur eine untergeordnete Rolle. Dies bestätigt das Modell, in dem die Bindung von Phosphopeptiden an die N-SH2-Domäne Voraussetzung für die intramolekulare Umordnung der Phosphatase ist [13]. Deutlich wurde auch, dass die effizienteste Variante der SHP-1 Aktivierung die Bindung von zwei Phosphopeptiden oder eines biphosphorylierten Liganden an beide SH2-Domänen ist. Die relativ hohe Restaktivität im SHP-1-R32/138K-Konstrukt zeigt jedoch, dass eine Interaktion der Peptide über die Positionen *poY*-2, *poY*+1 und *poY*+3 unabhängig vom *poY* ausreicht, um eine geringe Aktivierung auszulösen [33]. Der für Arg substituierte Lys Rest innerhalb der Domäne kann möglicherweise auch aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen begrenzt zur Assoziation beitragen. Eine Hemmung der *poY*-Bindung kann auch durch Substitution des Arg-Restes mit Ala erreicht werden [196]. Die Änderung der Ladung in dieser Position beeinflusst jedoch möglicherweise die Faltung der Proteindomäne.

5.4.3. Affinität ausgewählter Liganden für die GST-C-SH2-Domäne

Um die Bindung ausgewählter Peptidliganden an die C-SH2-Domäne zu quantifizieren, wurden Biacore-Messungen mit der GST-C-SH2-Domäne durchgeführt.

Alle getesteten Peptidliganden wiesen eine niedrigere Affinität für die GST-C-SH2-Domäne auf (Tab. 10). Für Ros *poY*²²⁶⁷ wurde im Vergleich zur GST-N-SH2-Domäne ein 1.7-fach höherer K_D -Wert bestimmt. Unterschiede wurden auch in der Bindungskinetik festgestellt (Tab. 11). Im Falle der GST-C-SH2-Domäne wurde kein Gleichgewichtszustand erreicht. Zur Berechnung der Dissoziationskonstanten konnte deshalb nur der *separate fit* (BIAevaluation Software 3.0) benutzt werden. Die Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeit war im Vergleich zur GST-N-SH2-Domäne stark verlangsamt (Abb. 23). Das Konstrukt der GST-C-SH2-Domäne enthält C-terminal neben der eigentlichen C-SH2-Domäne zusätzliche Aminosäuren (Aminosäuren 209-298). Dies beeinflusst wahrscheinlich die Proteinkonformation und somit die Flexibilität der Domäne. Wie auch im Falle der N-SH2-Domäne beschrieben, übt die Größe des Konstrukts (GST-Fusionsprotein vs. freie N-SH2-Domäne) einen entscheidenden Einfluss auf die Bindungskinetik aus. Für einen Vergleich der kinetischen Konstanten sollte deshalb für weitere Arbeiten ein neues Konstrukt der C-SH2-Domäne hergestellt werden.

Die cyclischen Peptide **13** und **14** wiesen eine höhere Affinität als Ros *poY*²²⁶⁷ für die GST-C-SH2-Domäne auf. Dagegen interagierten die Peptide **18** und **19**, die als stärkste Bindungspartner der N-SH2-Domäne dieser Studie charakterisiert wurden, deutlich schlechter

mit der GST-C-SH2-Domäne. Die beiden Peptide **20** und **21** wurden als Vertreter der Konsensussequenz Klasse II der N-SH2-Domäne synthetisiert. Die Spezifitäten der C-SH2-Domäne überlagern stark mit der Klasse II der N-SH2-Domäne. Eine hohe Affinität dieser Liganden für die C-SH2-Domäne wurde deshalb erwartet. Die Ergebnisse der Biacore-Messungen bestätigen diese Annahme. Sowohl Peptid **20** als auch **21** zeigten im Vergleich zu Ros *poY*²²⁶⁷ eine höhere Affinität für die Domäne. Dabei wurde jedoch, ähnlich wie für die GST-N-SH2-Domäne beschrieben, durch die Cyclisierung der Sequenz keine Affinitätssteigerung erzielt (Tab. 10).

Tab. 11. Vergleich der kinetischen Konstanten und der K_D -Werte der SH2-Domänen von SHP-1 für die Bindung von Ros *poY*²²⁶⁷ [176, 183].

Protein	k_{on} ($10^4 M^{-1} s^{-1}$)	k_{off} ($10^{-2} s^{-1}$)	K_D (in μM)
GST-N-SH2 (SHP-1)	$2,94 \pm 0,46$	$3,28 \pm 0,20$	$1,44 \pm 0,45$
GST-C-SH2 (SHP-1)	$0,067 \pm 0,009$	$0,164 \pm 0,061$	$2,44 \pm 0,97$

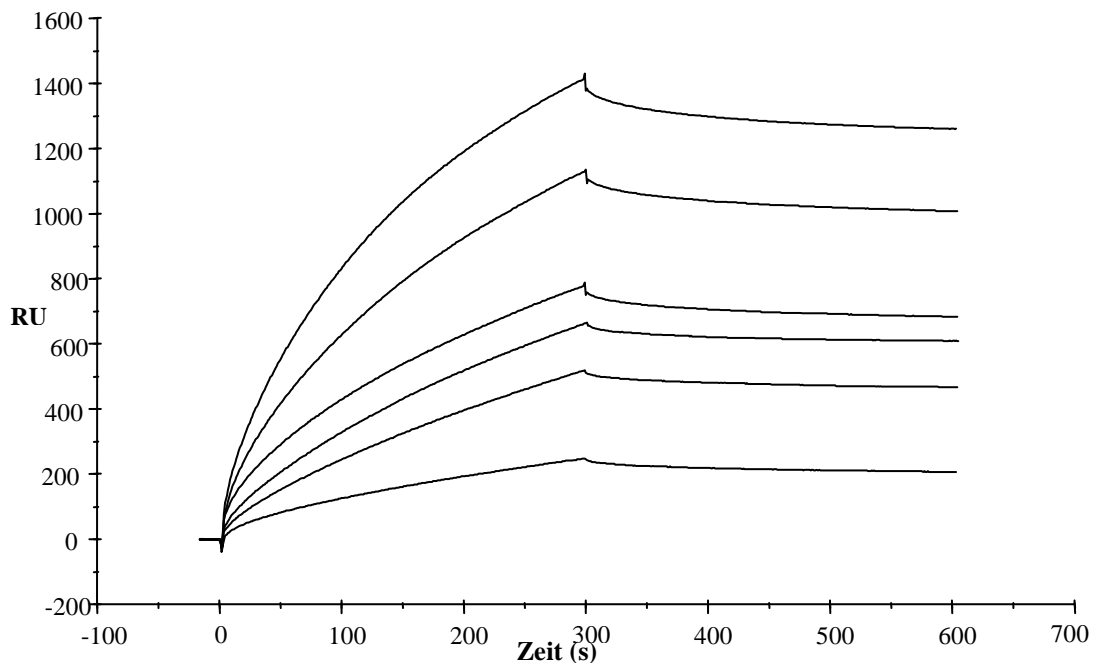


Abb. 23. Sensogramm der Bindung von Ros *poY*²²⁶⁷ an die N-SH2-Domäne von SHP-1.

Es wurden steigende Konzentrationen (0-1000 nM) von GST-N-SH2-Domäne injiziert. Die Assoziations- und Dissoziationszeit betrug 300 sec. Die RU-Level im Gleichgewicht (RUeq) wurden anschließend gegen die Proteinkonzentration aufgetragen. Die Auswertung erfolgte mit der BIAevaluation Software 3.0 unter Einbeziehung der Assoziations- (k_{on}) und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{off}) (*Separate fit*) und des *steady state*-Modells (Tab. 10).

Die bisher dargestellten Daten sind Bestandteil von drei Veröffentlichungen [175, 176, 183].

5.4.4. Alternative Bindungsstudien mit Fluoreszenz-Anisotropie

In der Entwicklung von SH2-Domänen-Effektoren ist die sensitive Bestimmung von Bindungskonstanten essentiell zur Charakterisierung der Liganden. Dafür stehen verschiedene Strategien zur Auswahl. Als Standardmethoden werden Radioligandenbindungsstudien [197], Interaktionsanalysen mittels SPR [155] sowie ITC-Messungen [198] genutzt. Auch mit Hilfe von Fluoreszenz-Anisotropie- bzw. Fluoreszenz-Polarisations-Messungen können Affinitätskonstanten *in vitro* bestimmt werden. Die Grundlagen der Fluoreszenz-Polarisation wurden von Perrin [199] beschrieben. Demnach ist nach Anregung mit linear polarisiertem Licht das vom Fluorophor emittierte Licht ebenfalls polarisiert. Die Emission wird jedoch durch Rotationsdiffusion depolarisiert. Die Größe und Konformation des Moleküls beeinflusst die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Rotationsdiffusion während des angeregten Zustands. Die Rotationsdiffusion wird als Winkelverschiebung zwischen den elektronischen Feldstärkevektoren von Anregungs- und Emissionsübergangsdipolelement, die während der Absorption und Emission eines Photons auftritt, gemessen [200]. Die Begriffe Polarisation und Anisotropie beschreiben dasselbe Phänomen. Die physikalisch sinnvollere Messgröße stellt allerdings die Anisotropie dar, da sie die Beiträge aller Polarisationsrichtungen der emittierenden Strahlung berücksichtigt [201].

$$r = r_0 / 1 + (\tau_F / \tau_R) \text{ (Perrin-Gleichung)}$$

r = Anisotropie, r_0 = intrinsische Anisotropie in Abwesenheit von Molekülrotation, τ_F = Fluoreszenzlebensdauer, τ_R = Rotationsrelaxationszeit

Die Erhöhung der Molekülmasse nach Bindung zweier Interaktionspartner führt zur Erhöhung der Rotationsrelaxationszeit. Aufgrund der Abhängigkeit der Anisotropie r von der Rotationsrelaxationszeit eignet sich diese Methode zur Bestimmung von Bindungskonstanten und wurde in dieser Arbeit angewendet, um die über SPR-ermittelten Daten zu evaluieren.

Im Vergleich zu Biacore liegen bei Fluoreszenz-Anisotropie-Messungen beide Bindungspartner in Lösung vor. Ein Interaktionspartner muss mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden. Um nach der Bindung eine möglichst große Änderung an Anisotropie zu detektieren, wählt man den kleineren Bindungspartner zur Markierung aus [202]. In unserem System wurde das Referenzpeptid Ros *poY*²²⁶⁷ mit 5-Carboxy-fluorescein gekoppelt. Um zu testen, welche Peptidkonzentration benötigt wird, um ein stabiles Signal zu detektieren, wurde zuerst die Anisotropie bei verschiedenen Peptidkonzentrationen bestimmt. Wie auch von Lynch et al. [202] beschrieben, ist eine Peptidkonzentration von 20 nM optimal.

Anschließend wurde die Peptidlösung mit steigenden Proteinkonzentrationen (GST-N-SH2-Domäne von SHP-1) versetzt und die Änderung der Anisotropie bestimmt. Diese Messung wurde im 96-well Format an einem POLARstar Optima (BMG Labtech) durchgeführt. Der mittels Fluoreszenz-Anisotropie-Messung bestimmte K_D -Wert stimmt gut mit dem über SPR ermittelten Wert überein (Tab. 12, Abb. 24).

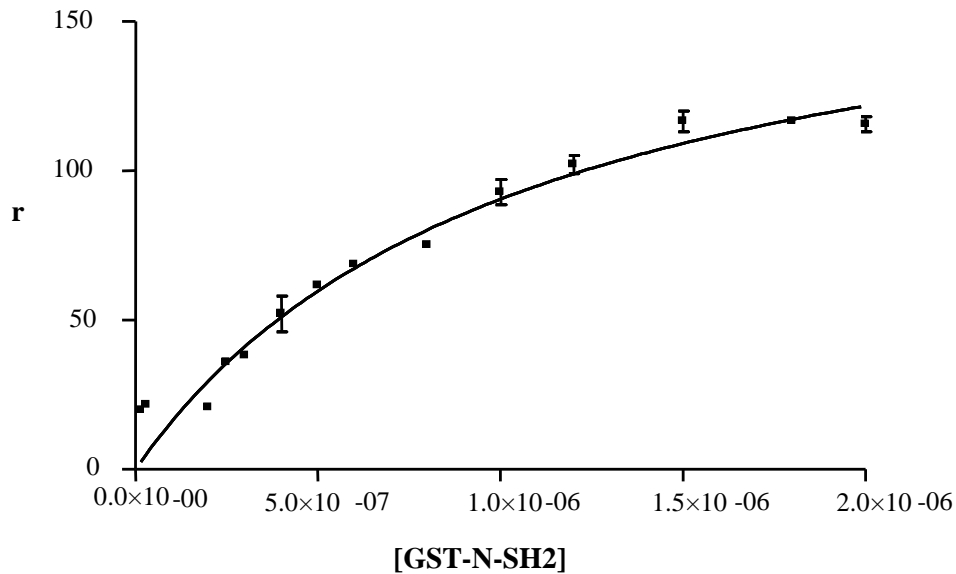


Abb. 24. Bindungskurve der Interaktion von CF-Ros pOY^{2267} mit der GST-N-SH2-Domäne, Steigende Konzentrationen an GST-N-SH2-Domäne (15 – 2000 nM) wurden mit 20 nM CF-Ros pOY^{2267} versetzt. Die Anisotropie wurde durch Anregung bei 485 nm und Emission bei 520 nm bestimmt. Die Anisotropie-Werte r wurden gegen die Proteinkonzentration aufgetragen und in der GraphPadPrism 2.0 Software mittels *One site binding*-Modell ausgewertet.

Tab. 12. Vergleich der K_D -Werte der Interaktion von Ros pOY^{2267} und der GST-N-SH2-Domäne mittels SPR und Fluoreszenz-Anisotropie-Messung.

Methode	K_D in μM
SPR	$1,44 \pm 0,45$
Fluoreszenz-Anisotropie	$1,10 \pm 0,25$

Um die Affinität ausgewählter Liganden zu bestimmen, wurde im Anschluss ein kompetitiver Test durchgeführt. Dafür wurden konstante Protein- und CF-Ros pOY^{2267} -Konzentrationen mit steigenden unmarkierten Peptidmengen versetzt. Nach 15 min Inkubation wurde die Inhibierung der Assoziation zwischen der GST-N-SH2-Domäne und CF-Ros pOY^{2267} , ausgelöst durch die N-terminal unmodifizierten Peptide, bestimmt. Die daraus resultierenden IC_{50} -Werte geben Auskunft über die Affinität der Bindung (Abb. 25, Tab. 13).

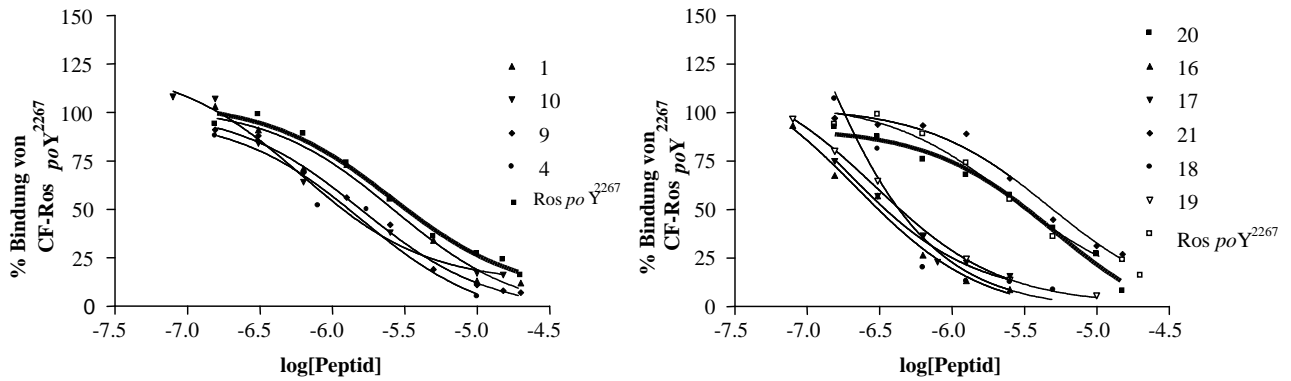


Abb. 25. Verdrängungsexperimente mittels Fluoreszenz-Anisotropie.

Steigende Konzentrationen unmarkierter Phosphopeptidliganden wurden zu einem Ansatz aus CF-Ros poY^{226} (20 nM) und GST-N-SH2 (1 μ M) gegeben. Nach 15 min Inkubation wurde die Anisotropie bestimmt. Die Werte wurden relativ zur Anisotropie des markierten Peptid (CF-Ros poY^{2267} , 20 nM) gesetzt, gegen die Peptidkonzentration aufgetragen und der IC_{50} -Wert mittels GraphPadPrism 2.0 Software ermittelt.

Tab. 13. Vergleich der IC_{50} -Werte der Fluoreszenz-Anisotropie-Messungen mit den K_D -Werten der SPR-Interaktionsanalysen.

Nr.	Peptid	IC_{50}^a (μ M)	K_D (μ M) (GST-N-SH2) ^b
Ros poY^{2267}	EGLNpYMVL	$2,58 \pm 0,04$	$1,44 \pm 0,45$
1	EGLNpYFVL	$2,06 \pm 0,04$	$0,69 \pm 0,21$
4	EGLNpYMV-Hfe	$1,84 \pm 0,29$	$0,27 \pm 0,10$
9	EGLNpY-Nle-VL	$1,60 \pm 0,06$	$0,23 \pm 0,10$
10	EGLNpYFVF	$0,45 \pm 0,12$	$0,12 \pm 0,02$
16	EGLNpYFVHfe	$0,22 \pm 0,05$	$0,09 \pm 0,01$
17	EGLNpYNleVHfe	$0,38 \pm 0,12$	$0,11 \pm 0,15$
18	EGLKpYFDHfe COCH ₂ NH	$0,18 \pm 0,19$	$0,06 \pm 0,01$
19	EGLKpYNleDHfe COCH ₂ NH	$0,29 \pm 0,07$	$0,06 \pm 0,01$
20	EGLNpYAVL	$5,02 \pm 0,18$	$0,39 \pm 0,07$
21	EGLKpYADL COCH ₂ NH	$4,79 \pm 0,17$	$0,70 \pm 0,12$

^aDie IC_{50} -Werte sind unter Verwendung der GraphPadPrism 2.0 Software (*One site competition*-Modell) berechnet worden. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Messungen.

^bZur Berechnung der K_D -Werte wurde die BIAevaluation Software 3.0 (*Separate fit, steady state*-Modell) benutzt.

Die Relationen der IC_{50} -Werte stimmen für die Peptide **1, 4, 9, 10, 16, 17, 18** und **19** gut mit den Ergebnissen der Biacore-Messungen überein. Erneut zeigten die Liganden **16, 17, 18** und **19** die höchste Affinität für die GST-N-SH2-Domäne. Im Vergleich zu Ros poY^{2267} ist die Bindungsstärke von Peptid **18** im Fluoreszenz-Anisotropie-Test etwa 14-fach erhöht, in den Biacore-Messungen wurde eine etwa 20-fach stärkere Bindung ermittelt. Erstaunlicherweise konnten die Peptide **20** und **21** schlechter mit der GST-N-SH2-Domäne interagieren. Dies

steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der Biacore-Messungen, in denen auch für diese Peptide eine im Vergleich zu Ros *poY*²²⁶⁷ höhere Affinität für die GST-N-SH2-Domäne bestimmt wurde. Da das Fluoreszenzspektrometer nur kurzzeitig als Leihgerät zur Testung bereitstand, konnten keine weiteren Messungen vorgenommen werden, die eventuell zur Klärung beigetragen hätten.

Im Vergleich der Methoden untereinander konnten im Falle der Bestimmung von direkten Bindungskonstanten (K_D -Werte) beide Methoden übereinstimmende Ergebnisse liefern. Ein Vorteil der Fluoreszenz-Anisotropie-Messungen im Vergleich zu Biacore ist, dass die einzelnen Proteinkonzentrationen gleichzeitig gemessen werden können, während in den Biacore-Studien die Konzentrationen nacheinander über den Chip geleitet werden müssen. Neben der Zeitersparnis sind im Falle der Fluoreszenz-Anisotropie-Messungen auch geringere Proteinmengen nötig (50 μ l vs. 150 μ l Probenvolumen). Im Gegensatz zu Biacore können mittels Fluoreszenz-Anisotropie-Messungen nur Aussagen zur Affinität (K_D -Wert) des Liganden, jedoch nicht zur Kinetik der Bindung getroffen werden. Die Bestimmung von indirekten Bindungskonstanten (IC_{50}) ist mit beiden Methoden möglich. Da im Falle der Fluoreszenz-Anisotropie-Messung die Konzentration des markierten Peptides bekannt ist, könnten aus den IC_{50} -Werten mittels Cheng-Prusoff-Gleichung die Dissoziationskonstante (K_i) der kompetitiven Peptide bestimmt werden [203]. Die Umrechnung ist jedoch nur möglich, wenn die Gesamtkonzentration an inhibierendem Peptid gleich der Konzentration an freiem Hemmer ist und wenn der Hemmmechanismus bekannt ist. Um Fehlinterpretationen zu vermeiden, wird deshalb in der Fachwelt meist darauf verzichtet, eine Umrechnung vorzunehmen. Die Bestimmung von IC_{50} -Werten wird eher im Screening von z.B. einer Vielzahl von Peptidanaloga genutzt [202, 204-206]. Um sensitive Bindungsdaten (K_D -Werte) zu erhalten, müssen deshalb anschließend immer direkte Bindungsstudien zwischen den vielversprechendsten Liganden und Bindungspartner folgen.

5.4.5. Untersuchung der Bindung ausgewählter Phosphopeptide an SHP-1 und SHP-2 in einem *in vitro*-Pull-down-Assay

Die bisher durchgeführten Bindungsstudien wurden jeweils mit der rekombinant hergestellten SH2-Domäne durchgeführt. Um zu testen, ob die Phosphopeptidliganden auch mit zellulärer SHP-1 interagieren können, wurde ein Pull-down-Assay durchgeführt. Im Gegensatz zu den Bindungsstudien mit den isolierten SH2-Domänen können die Liganden im Pull-down-Assay mit beiden SH2-Domänen interagieren. Die Phosphatase SHP-1 weist eine hohe Sequenz- und Strukturhomologie, besonders innerhalb der SH2-Domänen, mit SHP-2 auf [13, 17]. Es

wird deshalb erwartet, dass die in dieser Arbeit untersuchten Phosphopeptidliganden auch mit SHP-2 interagieren können. Um diese Behauptung zu überprüfen, wurde der Pulldown-Assay deshalb auch mit SHP-2 durchgeführt.

Als Zellsystem wurden 293T-Zellen gewählt, in denen endogen keine SHP-1 exprimiert wird (Abb. 26). Obwohl in den 293T-Zellen SHP-2 vorkommt, ist die Basalkonzentration gering. Im Western Blot konnte deshalb verglichen mit den überexprimierenden Zellen kein SHP-2 nachgewiesen werden (Abb.26).

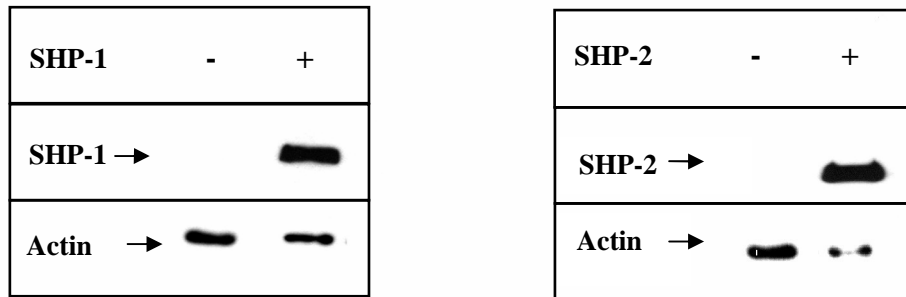


Abb. 26. Expressionslevel von SHP-1 bzw. SHP-2 in 293T-Zelllysaten.

293T-Zellen wurden mit SHP-1 bzw. SHP-2 transient transfiziert. Nach 48-72 Stunden wurden die Zellen lysiert. Die Expressionsspiegel wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot von Lysat-Aliquoten (gleiche Proteinmengen) analysiert.

Die SHP-1 bzw. SHP-2 überexprimierenden Zellen wurden nach 48-72 Stunden lysiert und mit den biotinylierten Phosphopeptiden (Ros poY^{2267} , **1, 4, 9, 10, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21**) inkubiert. Anschließend wurden die biotinylierten Peptide mit Streptavidin-Sepharose präzipitiert. Spezifisch gebundene SHP-1 bzw. SHP-2 konnte mittels SDS-PAGE und Western Blot nachgewiesen werden. Um unspezifische Bindungen der Peptide auszuschließen, wurde parallel als Negativkontrolle ein Pulldown des Referenzpeptides mit dem Lysat untransfizierter Zellen durchgeführt. Zusätzlich wurde die Interaktion der Phosphatasen mit dem unphosphorylierten Pendant von Ros bestimmt.

Alle getesteten Phosphopeptidliganden waren in der Lage mit SHP-1 zu interagieren (Abb. 27). Im Vergleich zu Ros poY^{2267} wiesen die Peptide **1, 9, 14, 18, 19** eine höhere Affinität auf, jedoch waren die Unterschiede in der Bindungsstärke nur marginal. So ist die Affinität der Peptide **18** und **19** im Vergleich zu Ros poY^{2267} nur 1,1-fach erhöht (Abb. 27). Sowohl in den Biacore-Bindungsstudien als auch in den Fluoreszenz-Anisotropie-Messungen wurden diese Liganden als die stärksten Interaktionspartner für die N-SH2-Domäne identifiziert. Im Vergleich zu Ros poY^{2267} war die Bindungsstärke des unphosphorylierten Ros-Liganden nur um etwa 30% reduziert. Dies ist erstaunlich gering, wird doch der Beitrag vom Phosphotyrosin für die Bindung des Liganden auf etwa 50% geschätzt [207]. Im Gegensatz zur

Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie, bei der spezifische Interaktionen zwischen Molekülen gemessen werden, können unspezifische Bindungen in diesem Testsystem nicht ausgeschlossen werden.

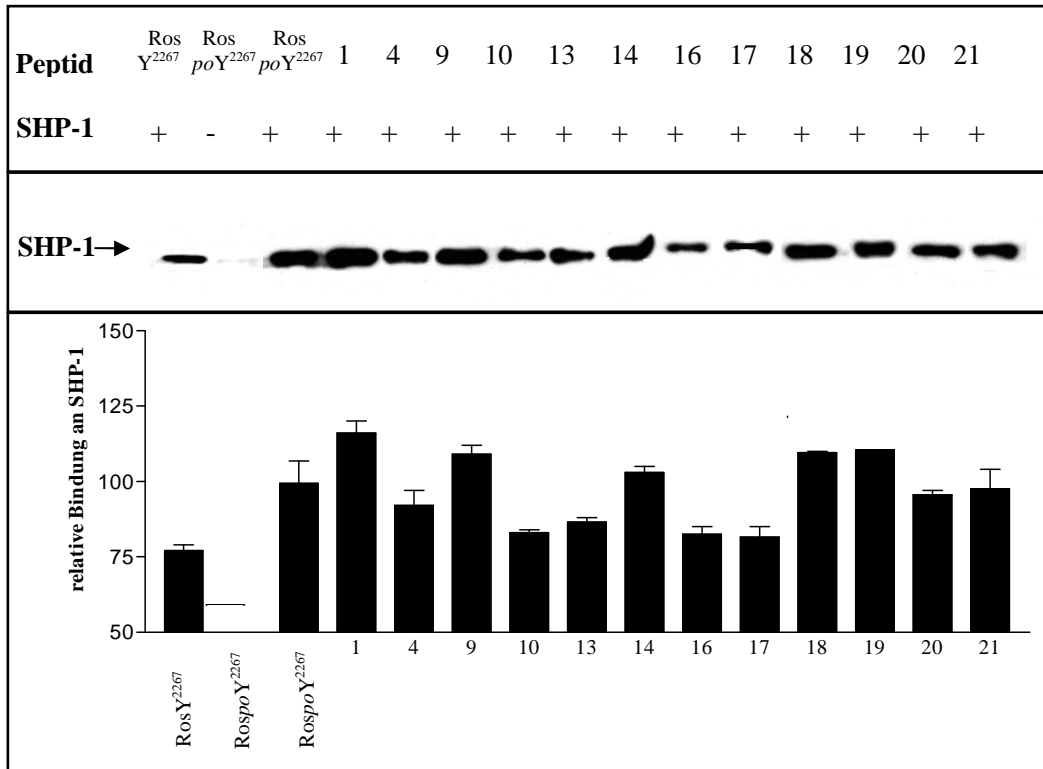


Abb. 27. SHP-1 bindet mit unterschiedlichen Affinitäten an Phosphopeptidliganden.

293T-Zellen wurden mit SHP-1 transient transfiziert. Nach 48-72 Stunden wurden die Zellen lysiert und entsprechend einer Konzentration von 50 µg mit biotinylierten Peptiden (5 µg) versetzt. Nach einer Inkubation (16 h, 4 °C) wurden die Peptide mittels Streptavidin-Sepharose präzipitiert (1 h, 4 °C). Die Beads wurden gewaschen und gebundenes SHP-1 wurde durch SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Zur Quantifizierung wurde die Intensität der einzelnen Banden relativ zur Stärke von Ros poY²²⁶⁷ gesetzt (Photo Paint 11.0).

Die strukturhomologe SHP-2 konnte mit allen Phosphopeptiden interagieren (Abb. 28). Dieses Resultat wurde erwartet, da die SH2-Domänen beider Phosphatasen überlappende Erkennungssequenzen aufweisen [136, 141]. Im Vergleich zu SHP-1 wurden größere Unterschiede in der Bindungsstärke der einzelnen Liganden detektiert. Die Peptide **4, 9, 10, 16, 17, 18, 19**, und **21**, die in den Biacore-Studien auch als stärkere Interaktionspartner als Ros poY²²⁶⁷ identifiziert wurden, zeigten auch für SHP-2 eine höhere Affinität. Die Interaktion von SHP-2 mit unphosphoryliertem Ros war im Vergleich zum phosphoryliertem Pendant zu 50% reduziert. Wie die Ergebnisse des Pulldown-Assays zeigen, können die für SHP-1 ermittelten Bindungsdaten auch auf SHP-2 übertragen werden.

Während die Relationen der Peptide untereinander für SHP-2 gut mit den Daten der anderen Bindungsexperimente übereinstimmten, konnten für SHP-1 die Ergebnisse nur zum Teil bestätigt werden. Auch Sweeney et al. [141] konnten die mittels Biacore bestimmten Daten im Pulldown-

Assay nicht bestätigen. Als mögliche Ursache werden proteolytische Prozesse, die während der Übernacht-Inkubation der Lysate mit den Peptiden stattfinden, diskutiert. Da die Qualität des Antikörpers maßgeblich die Ergebnisse des Pulldown-Assays beeinflusst, könnten die unterschiedlichen Empfindlichkeiten im Testsystem auch auf die Antikörper zurückzuführen sein. Die benutzten Antikörper (SHP-1 und SHP-2) in diesem Assay waren gegen verschiedene Epitope im Protein gerichtet und zeigten auch in den Negativkontrollen (unphosphoryliertes Ros) unterschiedliche Empfindlichkeiten. Eine mögliche Fehlerquelle könnte auch zu intensives Waschen nach der Inkubation der Streptavidin-Beads mit dem Ansatz (Lysat mit Peptid) darstellen. Dieser Schritt ist zwar nötig, um unspezifisch gebundene Moleküle von den Streptavidin-Beads zu lösen, kann jedoch auch die Dissoziation des Peptid-Protein-Komplexes bewirken. In den SPR-basierten Bindungsstudien wurde deutlich, dass die Interaktion der Liganden mit der Domäne nur transient ist und dass die Injektion von Puffer bereits innerhalb von 5 min zu einer fast vollständigen Dissoziation des Komplexes führt.

Die Pulldown-Assays beider Proteine verdeutlichen jedoch, dass die in dieser Arbeit hergestellten Liganden auch vom intakten Protein gebunden werden. Quantitative Aussagen über die Bindungsstärke waren nur bedingt möglich.

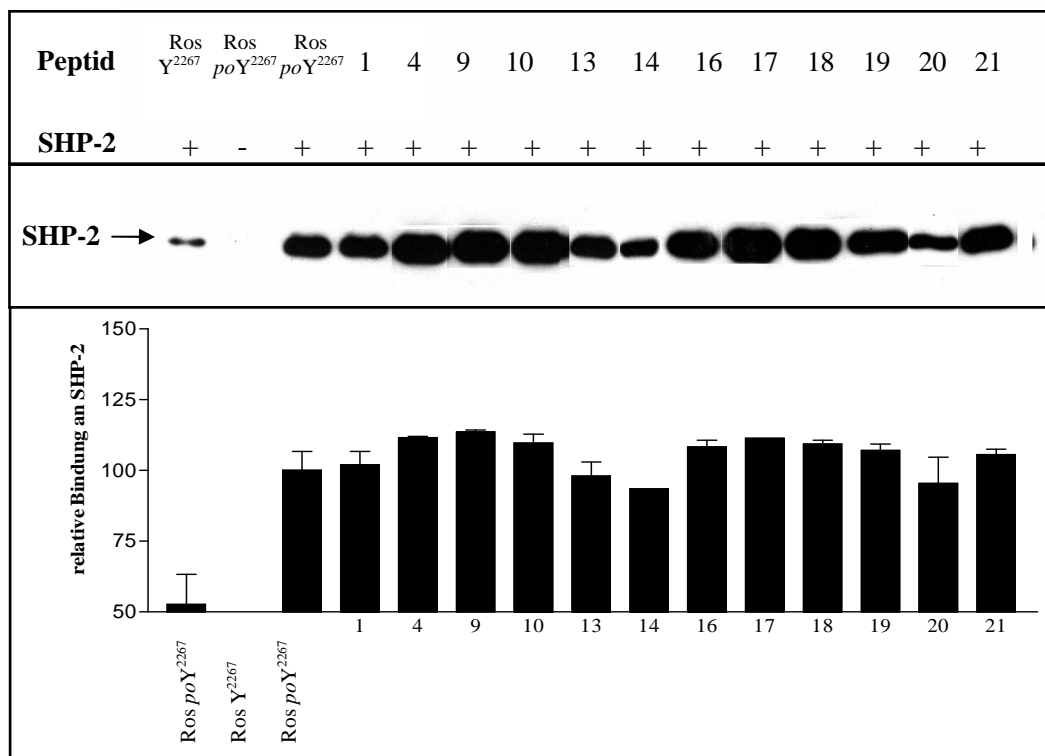


Abb. 28. SHP-2 bindet mit unterschiedlichen Affinitäten an Phosphopeptidliganden.

293T-Zellen wurden mit SHP-2 transient transfiziert. Nach 48-72 Stunden wurden die Zellen lysiert und entsprechend einer Konzentration von 50 µg mit biotinylierten Peptiden (5 µg) versetzt. Nach einer Inkubation (16 h, 4 °C) wurden die Peptide mittels Streptavidin-Sepharose präzipitiert (1 h, 4 °C). Die Beads wurden gewaschen und gebundenes SHP-2 wurde durch SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Zur Quantifizierung wurde die Intensität der einzelnen Banden relativ zur Stärke von Ros poY²²⁶⁷ gesetzt (Photo Paint 11.0).

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, detaillierte Kenntnisse über die konformationellen und strukturellen Anforderungen der SH2-Domänen, insbesondere der N-terminalen SH2 (N-SH2)-Domäne, von SHP-1 zu gewinnen und den Aktivierungsmechanismus, der durch die Bindung von monophosphorylierten (*poY*)-Liganden ausgelöst wird, genauer zu charakterisieren.

Dazu wurden aufbauend auf der Sequenz eines bekannten hochaffinen SHP-1-Interaktionspartners (Ros *poY*²²⁶⁷) und der in der Literatur vorgeschlagenen SH2-Konsensussequenzen synthetische Phosphopeptide abgeleitet und deren Wirksamkeit im Hinblick auf die Phosphataseaktivität und die Assoziation mit der N-SH2-Domäne überprüft. Vor der Synthese der Liganden wurde mittels Molecular Modeling die theoretische Passfähigkeit der Liganden in die Proteindomäne überprüft. Die Ros *poY*²²⁶⁷-Sequenz wurde daraufhin in den Positionen *poY*+1 und *poY*+3 durch den Einbau von bevorzugten Aminosäuren der Konsensussequenz Klasse I, den Einbau von nichtproteinogenen, konformationsstabilisierten Aminosäuren und durch Cyclisierung modifiziert. Für die Ringschlussreaktion wurden die Seitenketten der für die Interaktion mit der Domäne unbedeutenden Reste in *poY*-1 und *poY*+2 ausgewählt. Die Darstellung der Liganden und die anschließende Charakterisierung ihrer Fähigkeit, die Phosphataseaktivität von SHP-1 zu stimulieren, sowie ihrer Bindung an die SH2-Domänen bildeten wesentliche Schwerpunkte dieser Arbeit.

- 1.) Die Darstellung der linearen und cyclischen Phosphopeptide konnte durch die Verwendung geschützter Phosphotyrosinbausteine während der Festphasensynthese erfolgreich durchgeführt werden. Im Falle der linearen Peptidsequenzen wurde Phosphat-ungeschütztes Fmoc-Tyr(PO₃H₂)-OH eingesetzt, während für die Darstellung der cyclischen Sequenzen monobenzyl-geschütztes Fmoc-Tyr(PO(OBzl)OH)-OH benutzt wurde, um Nebenreaktionen während der Alloc/OAll-Abspaltung und Cyclisierung zu verhindern. Ein erfolgreicher Einbau der Verbrückungseinheit (Gly) in den Cyclus der Peptidsequenzen **13**, **14**, **18**, **19** und **21** wurde durch den Einsatz der in Lösung präparierten Dipeptidblöcke Fmoc-Asp(Gly-OAll)-OH bzw. Fmoc-Glu(Gly-OAll)-OH erzielt.
- 2.) In einem Phosphataseaktivitätstest unter Verwendung von *p*-Nitrophenylphosphat als Substrat wurde die Fähigkeit der Peptide, SHP-1 zu aktivieren, überprüft. Die Substitution der Positionen *poY*+1 durch die hydrophoben Aminosäuren Nle (**9**) und Phe (**1**) sowie

durch das Phe-Analogon Abu(β Ph) (**5**) führte zu stärker aktivierenden Liganden. In Position $poY+3$ erwies sich ein Austausch mit Abu(β Ph) (**6**), Ser(β Ph) (**8**) und Hfe (**4**) als optimal. Die Konfiguration der substituierten Aminosäure hatte ebenfalls einen entscheidenden Einfluss auf die enzymatische Aktivität. So waren nur die L-Konfiguration der Aminosäuren Abu(β Ph) und Ser(β Ph) in der Lage, eine Stimulation der Phosphataseaktivität zu bewirken. Durch Kombination dieser optimalen Aminosäuren in $poY+1$ und $poY+3$ konnte die Wirkung der Liganden zusätzlich verstärkt werden (**16** und **17**). Im Vergleich der vorgeschlagenen Konsensussequenz Klassen untereinander, konnten die Klasse I-Liganden (Ros poY^{2267} vs. Peptid **20**) eine stärkere Aktivierung auslösen.

Besonders interessant waren die Ergebnisse, die für die cyclischen Liganden erhalten wurden. In Abhängigkeit von der Struktur der Aminosäure in $poY+3$ des Liganden wurden entweder gering aktivierende Peptide (**13** und **14**) oder starke Aktivatoren (**18**, **19** und **21**) erhalten.

- 3.) Die Ergebnisse des Phosphataseaktivitätstests konnten für die linearen Phosphopeptide auch durch die Bindungsstudien mittels SPR-Spektroskopie bestätigt werden. Die Liganden, die die enzymatische Aktivität von SHP-1 stärker stimulierten, zeigten auch im Vergleich zur Leitstruktur eine höhere Affinität für die N-SH2-Domäne. Die Peptidsequenzen, die eine Kombination der bevorzugten Aminosäuren in beiden Positionen $poY+1$ und $poY+3$ enthalten, wurden als stärkste Interaktionspartner identifiziert.

Eine Unterscheidung innerhalb der cyclischen Liganden in Anlehnung an die Ergebnisse des Phosphataseaktivitätstests wurde nicht gefunden. Für alle cyclischen Liganden wurden im Vergleich zur Leitstruktur Ros poY^{2267} niedrigere K_D -Werte bestimmt. Deshalb wurde für die Peptide **13** und **14** anhand eines kompetitiven Phosphataseassays überprüft, ob die Liganden die enzymatische Aktivität als Inhibitoren modulieren. Für beide Sequenzen wurde jedoch nur eine partielle Inhibierung der Ros poY^{2267} -vermittelten Aktivierung der Phosphatase bestimmt. Im Vergleich der Bindungseigenschaften der beiden Konsensussequenz Klassen der N-SH2-Domäne zeigten hier die Peptidliganden der Klasse II eine höhere Affinität.

- 4.) Um Unterschiede in der Assoziation mit der N-SH2-Domäne zu untersuchen, die die gegensätzlichen Aktivitäten der Peptide **13** und **14** sowie **18**, **19** und **21** erklären, wurden diese Peptidliganden neben weiteren ausgewählten Liganden in die überlagerten Kristallstrukturen der komplexierten (PDGF poY^{740}) N-SH2-Domäne von SHP-2 (PDB1AYA) und der des vollständigen Enzyms (PDB2SHP) eingepasst. Für die beiden

Konsensussequenz Klassen wurden unterschiedliche Bindungsmodi festgestellt. So interagieren im Falle der Klasse I die Peptide in einer gekrümmten Konformation mit der Domäne, während die Klasse II-Phosphopeptide in einer gestreckten Konformation an die N-SH2-Domäne binden. Die Peptidkonformation entscheidet auch über den Interaktionsspielraum des *poY+3*-Restes mit der Domäne. Wie die Ergebnisse der Einpassung der cyclischen Liganden (**13**, **14**, **18**, **19**) zeigt, kann die Phosphatase nur aktiviert werden, wenn wie im Falle der Peptide **18** und **19**, der *poY+3*-Rest tief genug in die Bindungstasche hineinragt.

- 5.) Die Testung ausgewählter Peptidliganden hinsichtlich ihrer Fähigkeit, mit der C-SH2-Domäne zu interagieren, zeigte, dass aufgrund der überlappenden Selektivitäten in den Erkennungssequenzen eine Assoziation möglich ist. Wie erwartet, wiesen die optimierten Klasse I-Liganden eine niedrigere Affinität als die Klasse II-Liganden auf. In einem Phosphataseaktivitätstest mit in den SH2-Domänen mutierten SHP-1-Konstrukten konnte gezeigt werden, dass die Interaktion mit der C-SH2-Domäne die Stimulierung der Phosphataseaktivität nur gering beeinflusst. Die effizienteste Aktivierung von SHP-1 kommt über die Besetzung beider SH2-Domänen durch phosphorylierte Liganden zustande.
- 6.) Die Ergebnisse der Bindungsstudien wurden auch mit Hilfe anderer Methoden bestätigt. So wurden mittels Fluoreszenz-Anisotropie-Messungen vergleichbare Werte wie durch SPR erhalten. In einem Pulldown-Assay wurde gezeigt, dass alle Peptidliganden auch mit der intakten SHP-1 aus Zelllysaten interagieren können. Neben SHP-1 ist auch die strukturhomologe SHP-2 in der Lage als Bindungspartner zu fungieren.

Mit Hilfe der dargestellten Liganden konnten die strukturellen Anforderungen der SH2-Domänen von SHP-1 genauer charakterisiert werden. Im Gegensatz zu den Screenings der kombinatorischen Peptidbibliotheken, in denen die Spezifitäten der SH2-Domänen für ausschließlich proteinogene Aminosäuren bestimmt wurde, konnte erstmalig auch die Wirkung konformationell eingeschränkter Liganden auf die Phosphataseaktivität bewertet werden. Durch Untersuchung des Bindungsmodus wurden außerdem wertvolle Informationen zum Mechanismus der Aktivierung gewonnen. Dies bildet die Grundlage für die weitere Entwicklung von Modulatoren der SHP-1-Enzymaktivität.

Literaturverzeichnis

1. Hanks, S.K. und Hunter, T. (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.*, 9, 576-596.
2. Taylor, S.S., Knighton, D.R., Zheng, J., Sowadski, J.M., Gibbs, C.S., Zoller, M.J. (1993) A template for the protein kinase family. *Trends Biochem. Sci.*, 18, 84-89
3. Mc Cluskey, A., Sim, A.T.R., Sakoff, J.A. (2002) Serine-threonine protein phosphatase inhibitors: development of potential therapeutic strategies. *J. Med. Chem.*, 45, 1151-1175.
4. Larsen, M., Tremblay, M.L., Yamada, K.M. (2003) Phosphatases in cell-matrix adhesion and migration. *Nature*, 4, 700-711.
5. Stoker, A.W. (2005) Protein tyrosine phosphatases and signalling. *Journal of Endocrinology*, 185, 19-33.
6. Li, L. und Dixon, J.E. (2000) Form, function, and regulation of protein tyrosine phosphatases and their involvement in human diseases. *Semin Immunol.* 12, 75-84.
7. Östman, A., Hellberg, C, Böhmer F.D. (2006) Protein-tyrosine phosphatases and cancer. *Nature Review/Cancer*, 6, 307-320.
8. Hertog, J. (2003) Regulation of protein phosphatases in disease and behaviour *EMBO reports*, 4, 1027-1032.
9. Andersen, J.N., Mortensen, O.H., Peters, G.H., Drake, P.G., Iversen, L.F., Olsen, O.H., Jansen, P.G., Andersen, H.S., Tonks, N.T., Møller, N.P.H. (2001) Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains. *Mol. Cell. Biol.* 21, 7117-7136.
10. Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Friedberg, I., Ostermann, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J., Mustelin, T. (2004) Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*, 117, 699-711.
11. Rayapureddi, J.P., Kattamuri, C., Chan, F.H., Hegde, R.S. (2005) Characterization of a plant, tyrosine-specific phosphatase of the aspartyl class. *Biochemistry*, 44, 751-758.
12. Denu, J.M. und Dixon, J.E. (1998) Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 633-641.
13. Yang, J., Liu, L., He, D., Song, X., Liang, X., Zhao, Z.J., Zhou, G.W. (2003) Crystal structure of human protein-tyrosine phosphatase SHP-1. *J. Biol. Chem.*, 278, 6516-6520.
14. Keilhack H, David FS, McGregor M, Cantley LC, Neel BG. (2005) Diverse biochemical properties of Shp2 mutants. Implications for disease phenotypes. *J Biol Chem.*, 280, 30984-93.
15. Tidow, N., Kasper, B., Welte, K. (1999) SH2-containing protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 are dramatically increased at the protein level in neutrophils from patients with severe congenital neutropenia (Kostmann's syndrome). *Exp. Hematol.*, 27, 1038-1045
16. Huyer, G., Ramachandran, C. (1998) The specificity of the N-terminal SH2 domain of SHP-2 is modified by a single point mutation. *Biochemistry*, 37, 2741-2747.
17. Hof, P., Pluskey, S., Dhe-Paganon S., Eck, M.J., Shoelson, S.E. (1998) Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2. *Cell*, 92, 441-450.
18. Andersen, J.N., Jansen, P.G, Echwald, S.M., Mortensen, O.H., Fukada, T., Del Vecchio, R., Tonks, N.T., Møller, N.P.H. (2004) A genomic perspective on protein tyrosine phosphatases: gene structure, pseudogenes, and genetic disease linkage. *FASEB J.* 18, 8-30.
19. Shen, S-H., Bastien, L., Posner, B.I., Chrétien, P. (1991) A protein-tyrosine phosphatase with sequence similarity to the SH2 domain of the protein-tyrosine kinases. *Nature*, 352, 736-739.
20. Plutzky, J., Neel, B.G., Rosenberg, R.D. (1992) Isolation of a src homology 2-containing tyrosine phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89, 1123-1127.

21. Banville, D., Stocco, R., Shen, S.-H. (1995) Human protein tyrosine phosphatase 1C (PTPN6) gene structure: alternate promoter usage and exon skipping generate multiple transcripts. *Genomics*, 27, 165-173.
22. Tsui, H.W., Haselblatt, K., Martin, A., Mok, C.-H., Tsui, F.W.L. (2002) Molecular mechanisms underlying SHP-1 gene expression. *Eur. J. Biochem.*, 269, 3057-3064.
23. Martin, A., Tsui, H.W., Tsui, F.W.L. (1999) SHP-1 variant proteins are absent in motheaten mice despite presence of splice variant transcripts with open reading frames. *Mol. Immunol.*, 36, 1029-1041.
24. Jin, Y.J., Yu, C.-L., Burakoff, S.J. (1999) Human 70-kDa SHP-1L differs from 68-kDa SHP-1 in its C-terminal structure and catalytic activity. *J. Biol. Chem.*, 274, 28301-28307.
25. Yang J, Liang X, Niu T, Meng W, Zhao Z, Zhou GW. (1998) Crystal structure of the catalytic domain of protein-tyrosine phosphatase SHP-1. *J Biol Chem.*, 273, 28199-281207.
26. Wieligmann, K., De Castro, L.F.P., Zacharias, M. (2002) Molecular dynamics simulations on the free and complexed N-terminal SH2 domain of SHP-2. *Silico. Biol.*, 213, 305-311.
27. Yang, J., Cheng, Z., Niu, T., Liang, X., Zhao, Z.J., Zhou, G.W. (2000) Structural basis for substrate specificity of protein-tyrosine phosphatase SHP-1. *J. Biol. Chem.*, 275, 4066-4071.
28. Wang, P., Fu, H., Snavley, D.F., Freitas, M.A., Pei, D. (2002) Screening combinatorial libraries for optimal enzyme substrates by mass spectrometry. *Biochemistry*, 41, 6202-6210.
29. Frank, C., Burkhardt, C., Imhof, D., Ringel, J., Zschörnig, O., Wieligmann, K., Zacharias, M., Böhmer, F.D. (2004) Effective dephosphorylation of Src substrates by SHP-1. *J. Biol. Chem.*, 279, 11375-11383.
30. Teichmann, K., Winkler, R., Hampel, K., Trümpler, A., Böhmer, F.D., Imhof, D. (2006) *Biochem. J.*, eingereicht.
31. Pei, D., Neel, B., Walsh, C. (1993) Overexpression, purification, and characterization of SHPTP1, a Src homology 2-containing protein-tyrosine-phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90, 1092-1096.
32. Zhao, Z., Bouchard, P., Diltz, C. D., Shen, S. H., and Fischer, E. H. (1993) Purification and characterization of a protein tyrosine phosphatase containing SH2 domains. *J. Biol. Chem.* 268, 2816-2820.
33. Pei, D., Lorenz, U., Klingmüller, U., Neel, B.G., Walsh, C. (1994) Intramolecular regulation of protein tyrosine phosphatase SH-PTP1: a new function for Src homology 2 domains. *Biochemistry*, 33, 15483-15493.
34. Pei D., Wang J., Walsh C.T. (1996) Differential functions of the two Src homology 2 domains in protein tyrosine phosphatase SH-PTP1. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93, 1141-1145.
35. Barford, D. und Neel, B.G. (1998) Revealing mechanisms for SH2 domain mediated regulation of the protein tyrosine phosphatase SHP-2. *Structure*, 6, 249-254.
36. Pluskey, S., Wandless, T.J., Walsh, C.T., Shoelson, S.E. (1995) Potent stimulation of SH-PTP2 phosphatase activity by simultaneous occupancy of both SH2 domains. *J. Biol. Chem.*, 270, 2897-2900.
37. Sugimoto, S., Wandless, T.J., Shoelson, S.E., Neel, B.G., Walsh, C.T. (1994) Activation of the SH2-containing protein tyrosine phosphatase, SH-PTP2, by phosphotyrosine-containing peptides derived from insulin receptor substrate-1. *J. Biol. Chem.*, 269, 13614-13622.
38. Tenev, T., Keilhack, H., Tomic, S., Stoyanov, B, Stein-Gerlach, M., Lammers, R., Krivtsov, A.V., Ulrich, A., Böhmer, F.D. (1997) Both SH2 domains are involved in interaction of SHP-1 with the epidermal growth factor receptor but cannot confer receptor-directed activity to SHP-1/SHP-2 chimera. *J. Biol. Chem.*, 272, 5966-5973.

39. Vely, F., Vivier, F. (1997) Conservation of structural features reveals the existence of a large family of inhibitory cell surface receptors and noninhibitory/activatory counterparts. *J. Immunol.*, 159, 2075-2077.
40. Blery, M., Vivier, E. (1999) How to extinguish lymphocyte activation, immunotyrosine-based inhibition motif (ITIM)-bearing molecules a solution? *Clin. Chem. Lab. Med.*, 37, 187-191.
41. Eck, M.J., Pluskey, S., Trüb, T., Harrison, S.C., Shoelson, S.E. (1996) Spatial constraints on the recognition of phosphoproteins by the tandem SH2 domains of the phosphatase SH-PTP2. *Nature*, 379, 277-280.
42. Lorenz, U., Ravichandran, K.S., Pei, D., Walsh, C., Burakoff, S.J., Neel, B.J. (1994) Lck-dependent tyrosyl phosphorylation of the phosphotyrosine phosphatase SH-PTP1 in murine T cells. *Mol. Cell. Biol.*, 14, 1824-1834.
43. Uchida, T., Matozaki, T., Noguchi, T., Yamao, T., Horita, K., Suzuki, T., Fujioka, Y., Sakamoto, C., Kasuga, M. (1994) Insulin stimulates the phosphorylation of Tyr538 and the catalytic activity of PTP1C, a protein tyrosine phosphatase with Src homology-2 domains. *J. Biol. Chem.*, 269, 12220-12228.
44. Yoshida, K., Kharbanda, S., Kufe, D. Functional interaction between SHPTP1 and the Lyn tyrosine kinase in the apoptotic response to DNA damage. (1999) *J. Biol. Chem.*, 274, 34663-34668.
45. Bouchard, P., Zhao, Z., Banville, D., Dumas, F., Fischer, E.H., Shen, S-H. (1994) Phosphorylation and identification of a major tyrosine phosphorylation site in protein tyrosine phosphatase 1C *J. Biol. Chem.*, 269, 19585-19589.
46. Zhang, Z., Shen, K., Lu, W., Cole, P.A. (2003) The role of C-terminal tyrosine phosphorylation in the regulation of SHP-1 explored via expressed protein ligation. *J. Biol. Chem.*, 278, 4668-4674.
47. Frank, C., Keilhack, H., Opitz, F., Zschörnig, O., Böhmer, F.D. (1999) Binding of phosphatidic acid to the protein-tyrosine phosphatase SHP-1 as a basis for activity modulation. *Biochemistry*, 38, 11993-12002.
48. Jones, M.L., Craik, J.D., Gibbins, J.M., Poole, A.W. (2004) Regulation of SHP-1 tyrosine phosphatase in human platelets by serine phosphorylation at its C terminus. *J. Biol. Chem.*, 279, 40475-40483.
49. Brumell, J.H., Chan, C., K., Butler, J., Borregaard, N., Siminovitch, K.A., Grinstein, S., Downey, G.P. (1997) Regulation of Src homology 2-containing tyrosine phosphatase 1 during activation of human neutrophils. Role of protein kinase C. *J. Biol. Chem.*, 272, 875-882.
50. Meng, T.-C., Fukada, T., Tonks, N.K. (2002) Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Mol. Cell.*, 9, 387-399.
51. Forman, H.J., Fukuto, J.M., Torres, M. (2004) Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. *Am. J. Physiol.*, 278, C246-C256.
52. Lee, K., Esselmann, W.J. (2002) Inhibition of PTPs by H₂O₂ regulates the activation of distinct MAPK pathways. *Free Radic. Biol. Med.*, 33, 1121-32.
53. Cunnick, J.M., Dorsey, J.F., Mei, L., Wu, J. (1998) Reversible regulation of SHP-1 tyrosine phosphatase activity by oxidation. *Biochem Mol Biol Int.*, 45, 887-894.
54. Barrett, D.M., Black, S.M., Todor, H., Schmidt-Ulrich, R.K., Dawson, K.S., Mikkelsen, R.B. (2005) Inhibition of protein-tyrosine phosphatases by mild oxidative stresses is dependent on S-nitrosylation. *J. Biol. Chem.*, 280, 14453-14461.
55. Green, M.C., Shultz, L.D. (1975) Motheaten, an immunodeficient mutant of the mouse. I. Genetics and pathology. *J Hered.*, 66, 250-258.
56. Kozlowski, M., Mlinaric-Rascan, I., Feng, G.S., Shen, R., Pawson, T., Siminovitch, K.A. (1993) Expression and catalytic activity of the tyrosine phosphatase PTP1C is severely impaired in motheaten and viable motheaten mice. *J. Exp. Med.*, 178, 2157-2163.

57. Tsui, H.W., Siminovitch, K., A., Souza, L., Tsui, F.W.L. (1993) Motheaten and viable motheaten mice have mutations in the haematopoietic cell phosphatase gene. *Nat Genet.*, 4, 124-129.
58. Shultz, L.D., Schweitzer, P.A., Rajan, T.V., Yi, T., Ihle, J.N., Matthews, R.J., Thomas, M.L., Beier, D.R. (1993) Mutations at the murine motheaten locus are within the hematopoietic cell protein-tyrosine phosphatase (Hcph) gene. *Cell*, 73, 1445-1454.
59. Bone, H., Dechert, U., Jirik, F., Schrader, J.W., Welham, M.J. (1997) SHP1 and SHP2 protein-tyrosine phosphatases associate with betac after interleukin-3-induced receptor tyrosine phosphorylation. Identification of potential binding sites and substrates. *J. Biol. Chem.*, 272, 14470-14476.
60. Chen, H.E., Chang, S., Trub, T., Neel, B. (1996) Regulation of colony-stimulating factor 1 receptor signaling by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHPTP1. *Mol. Cell. Biol.*, 16, 3685-3697.
61. Ward, A.C., Oomen, S.P.M.A., Gits, J., Leeuwen, D. van, Soede-Bobok, A.A., Erpelinck-Verschueren, C.A.J., Yi, T., Touw, I.P. (2000) The SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1 is induced by granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and modulates signaling from the G-CSF receptor. *Leukemia*, 14, 1284-91.
62. Kozlowski, M., Larose, L., Lee, F., Le, D.M., Rottapel, R., Siminovitch, K.A. (1998) SHP-1 binds and negatively modulates the c-Kit receptor by interaction with tyrosine 569 in the c-Kit juxtamembrane domain. *Mol. Cell. Biol.*, 18, 2089-2099.
63. Fanger, N.A., Cosman, D., Peterson, L., Braddy, S.C., Maliszewski, C.R., Borges, L. (1998) The MHC class I binding proteins LIR-1 and LIR-2 inhibit Fc receptor-mediated signaling in monocytes. *Eur. J. Immunol.*, 28, 3423-3434.
64. Timms, J.F., Carlberg, K., Gu, H., Chen, H., Kamatkar, S., Nadler, M.J.S., Rohrschneider, L.R., Neel, B. (1998) Identification of major binding proteins and substrates for the SH2-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1 in macrophages. *Mol. Cell. Biol.*, 18, 3838-3850.
65. Taylor, V.C., Buckley, C.D., Douglas, M., Cody, A.J., Simmons, D.L., Freeman, S.D. (1999) The myeloid-specific sialic acid-binding receptor, CD33, associates with the protein-tyrosine phosphatases, SHP-1 and SHP-2. *J. Biol. Chem.*, 274, 11505-11512.
66. Kuroiwa, A., Yamashita, Y., Inui, M., Yuasa, T., Ono, M., Nagabukuro, A., Matsuda, Y., Takai, T. (1998) Association of tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2, inositol 5-phosphatase SHIP with gp49B1, and chromosomal assignment of the gene. *J. Biol. Chem.*, 273, 1070-1074.
67. Ganesan, L.P., Fang, H., Marsh, C.B., Tripandapami, S. (2003) The protein-tyrosine phosphatase SHP-1 associates with the phosphorylated immunoreceptor tyrosine-based activation motif of Fc gamma RIIa to modulate signaling events in myeloid cells. *J. Biol. Chem.*, 278, 35710-35717.
68. Xie, Z.-H., Zhang, J., Siraganian, R.P. (2000) Positive regulation of c-Jun N-terminal kinase and TNF-alpha production but not histamine release by SHP-1 in RBL-2H3 mast cells. *J. Immunol.*, 164, 1521-1528.
69. Daigle, I., Yousefi, S., Colonna, M., Green, D.R., Simon, H.U. (2002) Death receptors bind SHP-1 and block cytokine-induced anti-apoptotic signaling in neutrophils. *Nature Medicine*, 8, 61-67.
70. Yousefi, S., Simon, H-U. (2003) SHP-1: a regulator of neutrophil apoptosis. *Seminars in Immunology*, 15, 195-199.
71. Ihle JN. (1995) Cytokine receptor signalling. *Nature*, 377, 591-594.
72. Klingmüller, U., Lorenz, U., Cantley, L.C., Neel, B.G., Lodish, H.F. (1995) Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell*, 80, 729-738.
73. Jiao, H., Berrada, K., Yang, W., Tabrizi, M., Plataniias, L.C., Yi, T. (1996) Direct association with and dephosphorylation of Jak2 kinase by the SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Mol. Cell. Biol.*, 16, 6985-6992.

74. Bittorf, T., Seiler, J., Zhang, Z., Jaster, R., Brock, J. (1999) SHP1 protein tyrosine phosphatase negatively modulates erythroid differentiation and suppression of apoptosis in J2E erythroleukemic cells. *Biol. Chem.*, 380, 1201-1209.
75. Sidman, C.L., Shultz, R.R., Hardy, K., Hayakawa, K., Herzenberg, L.A. (1986) Production of immunoglobulin isotypes by Ly-1+ B cells in viable motheaten and normal mice. *Science*, 232, 1423-1425.
76. Greiner, D.L., Goldschneider, I., Komschlies, K.L., Medlock, E.S., Bollum, F.J., Shultz, L.D. (1986) Defective lymphopoiesis in bone marrow of motheaten (me/me) and viable motheaten (mev/mev) mutant mice. I. Analysis of development of prothymocytes, early B lineage cells, and terminal deoxynucleotidyl transferase-positive cells. *J. Exp. Med.*, 164, 1129-1144.
77. Sidman, C.L., Shultz, L.D., Unanue, E.R. (1978) The mouse mutant "motheaten". I. Development of lymphocyte populations. *J. Immunol.*, 121, 2392-2398.
78. Clark, E.A., Shultz, L.D., Pollack, S.B. (1981) Mutations in mice that influence natural killer (NK) cell activity. *Immunogenetics*, 12, 601-613.
79. Pani, G., Kozlowski, M., Cambier, J.C., Mills, G.B., Siminovitch, K.A. (1995) Identification of the tyrosine phosphatase PTP1C as a B cell antigen receptor-associated protein involved in the regulation of B cell signaling. *J. Exp. Med.*, 181, 2077-2084.
80. Mizuno, K., Tagawa, Y., Mitomo, K., Arimura, Y., Hatano, N., Katagiri, T., Ogimoto, M., Yakura, H. (2000) Src homology region 2 (SH2) domain-containing phosphatase-1 dephosphorylates B cell linker protein/SH2 domain leukocyte protein of 65 kDa and selectively regulates c-Jun NH2-terminal kinase activation in B cells. *J. Immunol.*, 165, 1344-1351.
81. Blasioli, J., Paust, S., Thomas, M.L. (1999) Definition of the sites of interaction between the protein tyrosine phosphatase SHP-1 and CD22. *J. Biol. Chem.*, 274, 2303-2307.
82. Wu, Y., Nadler, M.J.S., Brennan, L.A., Gish, G.D., Timms, J.F., Fusaki, N., Jongstra-Bilen, J., Tada, N., Pawson, T., Wither, J., Neel, B.G., Hozumi, N. (1998) The B-cell transmembrane protein CD72 binds to and is an in vivo substrate of the protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Curr Biol.*, 8, 1009-1017.
83. Bléry, M., Kubagawa, H., Chen, C-C., Vély, F., Cooper, M.D. (1998) The paired Ig-like receptor PIR-B is an inhibitory receptor that recruits the protein-tyrosine phosphatase SHP-1. *J. Biol. Chem.*, 95, 2446-2451.
84. Dustin, L.B., Plas, D.R., Wong, J., Hu, Y.H.T., Soto, C., Chan, A.C., Thomas, M.L. (1999) Expression of dominant-negative src-homology domain 2-containing protein tyrosine phosphatase-1 results in increased Syk tyrosine kinase activity and B cell activation. *J. Immunol.*, 162, 2717-2124.
85. Monroe, J.G. (2006) ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes. *Nat. Rev. Immunol.*, 6, 283-294.
86. Adachi, T., Flaswinkel, H., Yakura, H., Reth, M., Tsubata, T. (1998) The B cell surface protein CD72 recruits the tyrosine phosphatase SHP-1 upon tyrosine phosphorylation. *J. Immunol.*, 160, 4662-4665.
87. Carter, J.D., Calabrese, G.M., Naganuma, M., Lorenz, U. (2005) Deficiency of the Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1 (SHP-1) causes enrichment of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Journal Immunol.*, 174, 6627-6638.
88. Pani, G., Fischer, K-D., Mlinaric-Rascan, I., Siminovitch, K.A. (1996) Signaling capacity of the T cell antigen receptor is negatively regulated by the PTP1C tyrosine phosphatase. *J. Exp. Med.*, 184, 839-852.
89. Carter, J.D., Neel, B.G., Lorenz, U. (1999) The tyrosine phosphatase SHP-1 influences thymocyte selection by setting TCR signaling thresholds. *Int. Immunol.*, 11, 1999-2013.
90. Migone, T-S., Cacalano, N.A., Taylor, N., Yi, T., Waldmann, T.A., Johnston, J.A. (1998) Recruitment of SH2-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1 to the interleukin 2 receptor; loss

- of SHP-1 expression in human T-lymphotropic virus type I-transformed T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95, 3845-3850.
91. Lorenz, U., Ravichandran, K.S., Burakoff, S.J., Neel, B.G. (1996) Lack of SHPTP1 results in src-family kinase hyperactivation and thymocyte hyperresponsiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93, 9624-9629.
 92. Fawcett, V.C.J., Lorenz, U. (2005) Localization of Src homology 2 domain-containing phosphatase 1 (SHP-1) to lipid rafts in T lymphocytes: functional implications and a role for the SHP-1 carboxyl terminus. *J. Immunol.*, 174, 2849-2859.
 93. Kon-Kozlowski, M. Pani, G., Pawson, T., Siminovitch, K.A. (1996) The tyrosine phosphatase PTP1C associates with Vav, Grb2, and mSos1 in hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.*, 271, 3856-3862.
 94. Perez-Villar, J.P., Whitney, G.S., Bowen, M.A., Hewgill, D.H., Aruffo, A.A., Kanner, S.B. (1999) CD5 negatively regulates the T-cell antigen receptor signal transduction pathway: involvement of SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SHP-1. *Mol. Cell. Biol.*, 19, 2903-2912.
 95. Vilar-Coro, A.J., Rodríguez-Frade, J.M., De Ana, A.M., Moreno-Ortíz, C., Martínez-A., C., Mellado, M. (1999) *FASEB J.*, 13, 1699-1710.
 96. Henshall, T.L., Jones, K.L., Wilkinson, R., Jackson, D.E. (2001) The chemokine SDF-1 α triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *J. Immunol.*, 166, 3098-3106.
 97. Burshtyn, D.N., Scharenberg, A.M., Wagtmann, N., Rajagopalan, S., Berrada, K., Yi, T., Kinet, J-P., Long, E.O. (1996) Recruitment of tyrosine phosphatase HCP by the killer cell inhibitor receptor. *Immunity*, 4, 77-85.
 98. Le Dréan, E.L., Vély, F., Olcese, L., Cambiaggi, A., Guia, S., Krystal, G., Gervois, N., Moretta, A., Jotereau, F., Vivier, E. (1998) Inhibition of antigen-induced T cell response and antibody-induced NK cell cytotoxicity by NKG2A: association of NKG2A with SHP-1 and SHP-2 protein-tyrosine phosphatases. *Eur. J. Immunol.*, 28, 264-276.
 99. Carretero, M., Palmieri, G., Llano, M., Tullio, V., Santoni, A., Geraghty, D.E., López-Botet, M. (1998) Specific engagement of the CD94/NKG2-A killer inhibitory receptor by the HLA-E class Ib molecule induces SHP-1 phosphatase recruitment to tyrosine-phosphorylated NKG2-A: evidence for receptor function in heterologous transfectants. *Eur. J. Immunol.*, 28, 1280-1291.
 100. Keilhack, H., Tenev, T., Nyakatura, E., Godovac-Zimmermann, J., Nielson, L., Seedorf, K., Böhmer, F.D. (1998) Phosphotyrosine 1173 mediates binding of the protein-tyrosine phosphatase SHP-1 to the epidermal growth factor receptor and attenuation of receptor signaling. *J. Biol. Chem.*, 273, 24839-24846.
 101. Keilhack, H., Müller, M., Böhmer, S.-A., Frank, C., Weidner, K.M., Birchmeier, W., Ligensa, T., Berndt, A., Kosmehl, H., Günther, B., Müller, T., Birchmeier, C., Böhmer, F.D. (2001) Negative regulation of Ros receptor tyrosine kinase signaling. An epithelial function of the SH2 domain protein tyrosine phosphatase SHP-1. *J. Cell Biol.*, 152, 325-334.
 102. Keilhack, H., Hellmann, U., van Hengel, J., van Roy, F., Godovac-Zimmermann, J., Böhmer, F.D. (2000) The protein-tyrosine phosphatase SHP-1 binds to and dephosphorylates p120 catenin. *J. Biol. Chem.*, 275, 26376-26384.
 103. Tenev, T., Böhmer, S.-A., Kaufmann, R., Frese, S., Bittorf, T., Beckers, T., Böhmer, F.D. (2000) Perinuclear localization of the protein-tyrosine phosphatase SHP-1 and inhibition of epidermal growth factor-stimulated STAT1/3 activation in A431 cells. *Eur. J. Cell Biol.*, 79, 261-271.
 104. Craggs, G. und Kellie, S. (2001) A functional nuclear localization sequence in the C-terminal domain of SHP-1. *J. Biol. Chem.*, 276, 23719-23725.
 105. He, D., Song, X., Liu, L., Burk, D.H., Zhou, G.W. (2005) EGF-stimulation activates the nuclear localization signal of SHP-1. *J. Cell Biochem.*, 94, 944-953.

106. Duchesne, C., Charland, S., Asselin, C., Nahmias, C. (2003) Negative regulation of beta-catenin signaling by tyrosine phosphatase SHP-1 in intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 278, 14274-14283.
107. Schmidt-Arras, D. E., Böhmer, A., Markova, B., Choudhary, C., Serve, H., Böhmer, F.D. (2005) Tyrosine phosphorylation regulates maturation of receptor tyrosine kinases. *Mol. Cell. Biol.*, 25, 3690-3703.
108. Lopez, F., Estéve, J.-P., Buscail, L., Delesque, N., Saint-Laurent, N., Théveniau, M., Nahmias, C., Vaysse, N., Susini, C. (1997) The tyrosine phosphatase SHP-1 associates with the sst2 somatostatin receptor and is an essential component of sst2-mediated inhibitory growth signaling. *J. Biol. Chem.*, 272, 24448-24454.
109. Zhang, Q., Raghunath, P.N., Vonderheid, E., Ødum, N., Wasik, M.A. (2000) Lack of phosphotyrosine phosphatase SHP-1 expression in malignant T-cell lymphoma cells results from methylation of the SHP-1 promoter. *Am. J. Pathol.*, 157, 1137-1146.
110. Oka, T., Ouchida, M., Koyama, M., Ogama, Y., Takada, S., Nakatani, Y., Tanaka, T., Yoshino, T., Hayashi, K., Ohara, N., Kondo, E., Takahashi, K., Tsuchiyama, J., Tanimoto, M., Shimizui, K., Akagi, T. (2002) Gene silencing of the tyrosine phosphatase SHP1 gene by aberrant methylation in leukemias/lymphomas. *Canc. Res.*, 62, 6390-6394.
111. Chim, C.-S., Fung, T.-K., Cheung, W.-C., Liang, R., Kwong, Y.-L. (2004) SOCS1 and SHP1 hypermethylation in multiple myeloma: implications for epigenetic activation of the Jak/STAT pathway. *Blood*, 103, 4630-4635.
112. Johan, M.F., Bowen, D.T., Frew, M.E., Goodeve, A.C., Reilly, J.T. (2005) Aberrant methylation of the negative regulators RASSF1A, SHP-1 and SOCS-1 in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia. *Brit. J. Haematol.*, 129, 60-65.
113. Beghini, A., Ripamonti, C.B., Peterlongo, P., Roversi, G., Cairoli, R., Morra, E., La rizza, L. (2000) RNA hyperediting and alternative splicing of hematopoietic cell phosphatase (PTPN6) gene in acute myeloid leukemia. *Hum. Mol. Genet.*, 9, 2297-2304.
114. Blundell, T.L. in Cesareni, G., Gimona, M., Sudol, M., Yaffe, M. (2005) Modular protein domains. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Seite 1.
115. Sondermann H., Kuriyan J. (2005) C2 can do it, too. *Cell*, 121, 158-60.
116. Blaikie, P., Immanuel, D., Wu, J., Li, N., Yajnik, V., Margolis, B. (1994) A region in Shc distinct from the SH2 domain can bind tyrosine-phosphorylated growth factor receptors. *J. Biol. Chem.*, 269, 32031-32034.
117. Gustafson, T.A., He, W., Craparo, A., Schaub, C.D., O'Neill, T.J. (1995) Phosphotyrosine-dependent interaction of SHC and insulin receptor substrate 1 with the NPEY motif of the insulin receptor via a novel non-SH2 domain. *Mol. Cell. Biol.*, 15, 2500-2508.
118. Borg, J.P., Ooi, J., Levy, E., Margolis, B. (1996) The phosphotyrosine interaction domains of X11 and FE65 bind to distinct sites on the YENPTY motif of amyloid precursor protein. *Mol. Cell. Biol.*, 16, 6229-6241.
119. Howell B.W., Lanier L.M., Frank R., Gertler F.B., Cooper J.A., (1999) The disabled 1 phosphotyrosine-binding domain binds to the internalization signals of transmembrane glycoproteins and to phospholipids. *Mol. Cell. Biol.*, 19, 5179-88.
120. Uhlik, M.T., Temple, B., Bencharit, S., Kimple, A.J., Siderovski, D.P., Johnson, G.L. (2005) Structural and evolutionary division of phosphotyrosine binding (PTB) domains. *J. Mol. Biol.*, 345, 1-20.
121. Zhou, M.M., Huang, B., Olejniczak, E.T., Meadows, R.P., Shuker, S.P., Miyazaki, M., Trub T., Shoelson S.E., Fesik S.W. (1996) Structural basis for IL-4 receptor phosphopeptide recognition by the IRS-1 PTB domain. *Nat. Struct. Biol.*, 3, 388-393.

122. Ravichandran, K.S., Zhou, M.M., Pratt, J.C., Harlan, J.E., Walk, S.F., Fesik, S.W., Burakoff, S.J. (1997) Evidence for a requirement for both phospholipid and phosphotyrosine binding via the Shc phosphotyrosine-binding domain in vivo. *Mol. Cell. Biol.*, 17, 5540-5549.
123. Newton, A.C., Johnson, J.E. (1998) Protein kinase C: a paradigm for regulation of protein function by two membrane-targeting modules. *Biochem. Biophys. Acta*, 1376, 155-172.
124. Benes, C.H., Wu, N., Elia, A.E.H., Dharia, T., Cantley, L.C., Soltoff, S.P. (2005) The C2 domain of PKCdelta is a phosphotyrosine binding domain. *Cell*, 121, 271-280.
125. Nalefski, E.A., Falke, J.J. (1996) The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci.*, 5, 2375-2390.
126. Sadowski, I., Stone, J.C., Pawson, T. (1986) A noncatalytic domain conserved among cytoplasmic protein-tyrosine kinases modifies the kinase function and transforming activity of Fujinami sarcoma virus P130gag-fps. *Mol. Cell. Biol.*, 4396-4408.
127. Pawson T., Nash P. (2003) Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science*, 300, 445-452.
128. Yaffe, M.B. (2002) Phosphotyrosine-binding domains in signal transduction. *Nature Rev.*, 3, 177-186.
129. Kuriyan, J., Cowburn, D. (1993) Structures of SH2 and SH3 domains. *Curr. Biol.*, 3, 828-837.
130. Waksman, G., Shoelson, S.E., Pant, N., Cowburn, D., Kuriyan, J. (1993) Binding of a high affinity phosphotyrosyl peptide to the Src SH2 domain: crystal structures of the complexed and peptide-free forms. *Cell*, 72, 779-790.
131. Mayer, B.G., Jackson, P.K., Van Etten, R.A., Baltimore, D. (1992) Point mutations in the abl SH2 domain coordinately impair phosphotyrosine binding in vitro and transforming activity in vivo. *Mol. Cell. Biol.*, 12, 609-618.
132. Waksman, G., Kominos, D., Robertson, S.C., Pant, N., Baltimore, D., Brige, R.B., Cowburn, D., Hanafusa, H.H., Mayer, B.Overduin, M., Resh, M.D., Rios, C.B., Silverman, L., Kuriyan, J.(1992) Crystal structure of the phosphotyrosine recognition domain SH2 of v-src complexed with tyrosine-phosphorylated peptides. *Nature*, 358, 646-653.
133. Songyang, Z., Shoelson, S.E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W.G., King, F., Roberts, T., Raftnofsky, S., Lechleider, R.J., Neel, B.G., Brige, R.B., Fajardo, E.J., Chou, M.M., Hanafusa, H., Schaffhausen, B., Cantley, L.C. (1993) SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell*, 72, 767-778.
134. Campbell, S.J., Jackson, R.M. (2003) Diversity in the SH2 domain family phosphotyrosyl peptide binding site. *Protein Engineering*, 16, 217-227.
135. Beebe, K.D., Wang, P., Arabaci, G., Pei, D. (2000) Determination of the binding specificity of the SH2 domains of protein tyrosine phosphatase SHP-1 through the screening of a combinatorial phosphotyrosyl peptide library. *Biochemistry*, 39, 13251-13260.
136. Imhof, D., Wavreille, A-S., May, A., Zacharias, M., Tridandapani, S., Pei, D. (2006) Sequence specificity of SHP-1 and SHP-2 SH2 domains: Critical roles of residues beyond the pY+3 position. *J. Biol.Chem.* Epub ahead of print
137. Songyang, Z. Shoelson, S.E., McGlade, J., Olivier P., Pawson, T., Bustelo, X.R., Barbacid, M., Sabe, H., Hanafusa, H., Yi, T. (1994) Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav. *Mol. Cell. Biol.* 14, 2777-2785.
138. Burshtyn, D.N., Yang, W., Yi, T., Long, E.O. (1997) A novel phosphotyrosine motif with a critical amino acid at position -2 for the SH2 domain-mediated activation of the tyrosine phosphatase SHP-1. *J. Biol. Chem.* 272, 13066-13072.
139. Puntervoll P., Aasland R., in „Modular Protein Domains“, Cesareni, G., Gimona, M., Sudol, M., Yaffe, M. Wiley-VCH, 2005, Seite 477-486.

140. Sweeney M.C., Wavreille A.S., Park J., Butchar J.P., Tridandapani S., Pei D. (2005) Decoding protein-protein interactions through combinatorial chemistry: sequence specificity of SHP-1, SHP-2, and SHIP SH2 domains. *Biochemistry*, 44, 14932-14947.
141. Qin, Q., Wavreille, A.-S., Pei, D. (2005) Alternative mode of binding to phosphotyrosyl peptides by Src homology-2 domains. *Biochemistry*, 44, 12196-12202.
142. Yi T, Mui AL, Krystal G, Ihle JN.,(1993) Hematopoietic cell phosphatase associates with the interleukin-3 (IL-3) receptor beta chain and down-regulates IL-3-induced tyrosine phosphorylation and mitogenesis. *Mol. Cell. Biol.*, 13, 7577-7586.
143. Doody G.M., Justement L.B., Delibrias C.C., Matthews R.J., Lin J., Thomas M.L., Fearon D.T. (1995) A role in B cell activation for CD22 and the protein tyrosine phosphatase SHP. *Science*, 269, 242-244.
144. Law C.L., Sidorenko S.P., Chandran K.A., Zhao Z., Shen S.H., Fischer E.H., Clark E.A. (1996) CD22 associates with protein tyrosine phosphatase 1C, Syk, and phospholipase C-gamma(1) upon B cell activation. *J. Exp. Med.*, 183, 547-560.
145. Yi T., Ihle J.N. (1993) Association of hematopoietic cell phosphatase with c-Kit after stimulation with c-Kit ligand. *Mol. Cell. Biol.*, 13, 3350-3358.
146. Pumphrey N.J., Taylor V., Freeman S., Douglas M.R., Bradfield P.F., Young S.P., Lord J.M., Wakelam M.J., Bird I.N., Salmon M., Buckley C.D. (1999) Differential association of cytoplasmic signalling molecules SHP-1, SHP-2, SHIP and phospholipase C-gamma1 with PECAM-1/CD31. *FEBS Lett.*, 450, 77-83.
147. Paul S.P., Taylor L.S., Stansbury E.K., McVicar D.W. (2000) Myeloid specific human CD33 is an inhibitory receptor with differential ITIM function in recruiting the phosphatases SHP-1 and SHP-2. *Blood* 96, 483-90.
148. Tartaglia M., Niemeyer C.M., Fragale A., Song X., Buechner J., Jung A., Hahlen K., Hasle H., Licht J.D., Gelb B.D. (2003) Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Nat. Genet.*, 34, 148-150.
149. Tartaglia M., Mehler E.L., Goldberg R., Zampino G., Brunner H.G., Kremer H., van der Burgt I., Crosby A.H., Ion A., Jeffery S., Kalidas K., Patton M.A., Kucherlapati R.S., Gelb B.D. (2001) Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nat. Genet.*, 29, 465-468.
150. Morra M., Simarro-Grande M., Martin M., Chen A.S., Lanyi A., Silander O., Calpe S., Davis J., Pawson T., Eck M.J., Sumegi J., Engel P., Li S.C., Terhorst C. (2001) Characterization of SH2D1A missense mutations identified in X-linked lymphoproliferative disease patients. *J. Biol. Chem.*, 276, 36809-36816.
151. Furet, P., Gay, B., Garcia-Echeverria, C., Rahuel, J., Fretz, H., Schoepfer, J., Caravatti, G. (1997) Discovery of 3-aminobenzoyloxycarbonyl as an N-terminal group conferring high affinity to the minimal phosphopeptide sequence recognized by the Grb2-SH2 domain. *J. Med. Chem.*, 40, 3551-3556.
152. Garcia-Echeverria, C., Furet, P., Gay, B., Fretz, H., Rahuel, J., Schoepfer, J., Caravatti, G. (1998) Potent antagonists of the SH2 domain of Grb2: optimization of the X+1 position of 3-amino-Z-Tyr(PO3H2)-X+1-Asn-NH2. *J. Med. Chem.*, 41, 1741-1744.
153. Furet, P., Garcia-Echeverria, C., Gay, B., Schoepfer, J., Zeller, M., Rahuel, J., (1999) Structure-based design, synthesis, and X-ray crystallography of a high-affinity antagonist of the Grb2-SH2 domain containing an asparagine mimetic. *J. Med. Chem.*, 42, 2358-2363.
154. Gay, B., Suarez, S., Caravatti, G., Furet, P., Meyer, T., Schoepfer, J. (1999) Selective GRB2 SH2 inhibitors as anti-Ras therapy. *Int. J. Cancer*, 83, 235-241.
155. Oligino, L., Lung, F.D., Sastry, L., Bigelow, J., Cao, T., Curran, M., Burke Jr., T.R., Wang, S., Krag, D., Roller, P.P., King, C.R. (1997) Nonphosphorylated peptide ligands for the Grb2 Src homology 2 domain. *J. Biol. Chem.*, 272, 29046-29052.

156. Li, P., Zhang, M., Peach, M.L., Zhang, X., Liu, H., Nicklaus, M., Yang, D., Roller, P.P. (2003) Structural basis for a non-phosphorus-containing cyclic peptide binding to Grb2-SH2 domain with high affinity. *Biochem. Biophys. Res.*, 307, 1038-1044.
157. Long, Y.-Q., Lung, F.-D. T., Roller, P.P. (2003) Global optimization of conformational constraint on non-phosphorylated cyclic peptide antagonists of the Grb2-SH2 domain. *Bioorg. Med. Chem.*, 11, 3929-3936.
158. Yao, Z.J., King, C.R., Cao, T., Kelley, J., Milne, G.W. Voigt, J.H., Burke Jr., T.R. (1999) Potent inhibition of Grb2 SH2 domain binding by non-phosphate-containing ligands. *J. Med. Chem.*, 42, 25-35.
159. Gao, Y., Luo, J., Yao, Z.J., Guo, R., Zou, H., Kelley, J., Voigt, J.H., Yang, D., Burke Jr., T.R. (2000) Inhibition of Grb2 SH2 domain binding by non-phosphate-containing ligands. 2. 4-(2-Malonyl)phenylalanine as a potent phosphotyrosyl mimetic. *J. Med. Chem.*, 43, 911-920.
160. Bohacek, R.S., Dalgarno, D.C., Hatada, M., Jacobsen, V.A., Lynch, B.A., Macek, K.J., Merry, T., Metcalf III, C.A., Narula, S.S., Sawyer, T.K., Shakespeare, W.C., Violette, S.M., Weigele, M. (2001) X-Ray structure of citrate bound to Src SH2 leads to a high-affinity, bone-targeted Src SH2 inhibitor. *J. Med. Chem.*, 44, 660-663.
161. Plummer, M.S., Holland, D.R., Sharipour, A., Lunney, E.A., Fergus, J.H., Marks, J.S., McConnell, P., Müller, W.T., Sawyer, T.K. (1997) Design, synthesis, and cocrystal structure of a nonpeptide Src SH2 domain ligand. *J. Med. Chem.*, 40, 3719-3725.
162. Lunney, E.A., Para, K.S., Rubin, J.R., Humblet, C., Fergus, J.H., Marks, J.S., Sawyer, T.K. (1997) Structure based design of a novel series of nonpeptide ligands that bind to the pp60srcSH2 domain. *J. Am. Chem. Soc.*, 119, 12471-12476.
163. Deprez, P., Baholet, I., Burlet, S., Lange, R., Amengual, R., Schoot, B., Vermond, A., Mandinde, E., Lesuisse, D. (2002) Discovery of highly potent Src SH2 binders: structure-activity studies and X-ray structures. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 12, 1291-1294.
164. Plummer, M.S., Lunney, E.A., Para, K.S., Prasad, J.V.N.V., Sahripour, A., Singh, J., Stankovic, C., Humblet, C., Fergus, J.H., Marks, J.S., Sawyer, T.K. (1996) Hydrophobic D-amino acids in the design of peptide ligands for the pp60src SH2 domain. *Drug. Des. Disc.*, 13, 75- 81.
165. Park, J., Fu, H., Pei, D. (2003) Peptidyl aldehydes as reversible covalent inhibitors of SRC homology 2 domains. *Biochemistry*, 42, 5159-5167.
166. Zhao, R., Fu, X., Teng, L., Li, Q., Zhao, Z.J., (2003) Blocking the function of tyrosine phosphatase SHP-2 by targeting its Src homology 2 domains. *J. Biol. Chem.*, 278, 42893-42898.
167. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R., (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.*, 36, 59-74.
168. Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
169. Gill, S.C., von Hippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.*, 182, 319-326.
170. Arold, H., Reissmann, S. (1970) Peptide. XV. Synthese von Analoga des Bradykinins mit threo-Phenylserin. *J. prakt. Chem.*, 312, 1130-1144.
171. Arold, H., Reissmann, S., Eule, M. (1974) Peptide. XX [1]. Synthese von Bradykinin-Analoga mit Amino-phenylbuttersäure. *J. prakt. Chem.*, 316, 93-102-
172. Arold, H., Feist, H. (1970) Peptide. XVI. Synthese von Bradykinin-Analoga mit erythro-Phenylserin. *J. prakt. Chem.*, 312, 1145-1160.
173. Hruby, V. (1993) Conformational and topographical considerations in the design of biologically active peptides. *Biopolymers*, 33, 1073-1083.

174. Lee, H.-E., Kominos, D., Jaques, S., Margolis, B., Schlessinger, J., Shoelson, S.E., Kuriyan, J. (1994) Crystal structures of peptide complexes of the amino-terminal SH2 domain of the Syp tyrosine phosphatase. *Structure*, 2, 423-438.
175. Imhof, D., Nothmann, D., Zoda, M.S., Hampel, K., Wegner, J., Böhmer, F.D., Reissmann, S., (2005) Synthesis of linear and cyclic phosphopeptides as ligands for the N-terminal SH2-domain of protein tyrosine phosphatase SHP-1. *J Pept Sci.*, 11, 390-400.
176. Imhof D., Wieligmann K., Hampel K., Nothmann D., Zoda M.S., Schmidt-Arras D., Zacharias M., Bohmer F.D., Reissmann S. (2005) Design and biological evaluation of linear and cyclic phosphopeptide ligands of the N-terminal SH2 domain of protein tyrosine phosphatase SHP-1. *J. Med. Chem.* 48, 1528-1539.
177. McMurray, J.S., Coleman, I.V.D.R., Wang, W., Campbell, M.L. (2001) The synthesis of phosphopeptides. *Biopolymers*, 60, 3-31.
178. Bannwarth, W., Trzeciak, A. (1987) A Simple and Effective Chemical Phosphorylation Procedure for Biomolecules. *Helv. Chem. Acta*, 70, 175-186.
179. Kitas, E.A., Knorr, R., Trzeciak, A., Bannwarth, W. (1991) Alternative Strategies for the Fmoc Solid-Phase Synthesis of O4-Phospho-L-tyrosine-Containing Peptides. *Helv. Chim. Acta*, 74, 1314-1328.
180. Pascal, R., Schmidt, P.O., Mendre, C., Dufour, M.N., Guillon, G. Use of diisopropylcarbodiimide in the solid phase synthesis of phosphorylated peptides by the preformed phosphoamino acid building block approach. In *Peptides* (2000), Martinez, J., Fehrentz, J.A. (eds). EDK Paris, 2001, Seite 263-264.
181. White, P. Optimization of coupling methods for the introduction of mono-benzylphosphate esters of Fmoc protected phosphoamino acids. In *Peptides: The Wave of the Future*, Lebl, M., Houghten, R.A. (eds). Kluwer Academic: Norwell, 2001, 97-98.
182. Marfey, P. (1984) Determination of D-amino acids. II Use of a bifunctional reagent, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene. *Carlsberg Res. Commun.*, 49, 591-596.
183. Hampel, K., Kaufhold, I., Zacharias, M., Böhmer, F.D., Imhof, D. (2006) Phosphotyrosyl Peptide Ligands of the SHP-1 N-SH2 Domain: Effects on Binding and Stimulation of Phosphatase Activity. *Chem. Med. Chem.* im Druck.
184. Besser, D., Müller, B., Kleinwächter, P., Greiner, G., Seyfahrt, L., Steinmetzer, T., Arad, O., Reissmann, S. (2000) Synthesis and Characterization of Octapeptide Somatostatin Analogues with Backbone Cyclization: Comparison of Different Strategies, Biological Activities and Enzymatic Stabilities. *J. Prakt. Chem.*, 342, 537-545.
185. Nomizu, M., Otaka, A., Burke Jr., T.R., Roller, P.P. (1994) Synthesis of phosphomethylphenylalanine and phosphotyrosine containing cyclic peptides as inhibitors of protein tyrosine kinase/SHP2 interactions. *Tetrahedron*, 50, 2691-2702.
186. Burke Jr., T.R., Nomizu, M., Otaka, A., Smyth, M.S., Roller, P.P., Case, R.D., Wolf, G., Shoelson, S.E. (1994) Cyclic peptide inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase p85 SH2 domain binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 201, 1148-1153.
187. McMurray, J.S., Budde, R.J.A., Ke, S. (1998) Cyclic peptides as probes of the substrate binding site of the cytosolic tyrosine kinase, pp60c-src. *Arch. Biochem. Biophys.*, 355, 124-130.
188. Li, P., Peach, M.L., Zhang, M., Liu, H., Yang, D., Nicklaus, M., Roller, P.P. (2003) Structure-based design of thioether-bridged cyclic phosphopeptides binding to Grb2-SH2 domain. *Bioorg., Med. Chem. Lett.*, 13, 895-899.
189. Gothe, R. (1999) Synthese photoaffinitätsmarkierter Analoga des Bradykinin-potenzierenden Peptides BPP_{9a} zur Rezeptormarkierung. Dissertation, 37-40.
190. O' Shannessy, D.J., Brigham-Burke, M., Soneson, K.K., Hensley, P., Brooks, I. (1993) Determination of rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions using

- surface plasmon resonance: use of nonlinear least squares analysis methods. *Analyt. Biochem.*, 212, 457-468.
191. Ladbury J.E., Lemmon M.A., Zhou, M., Green J., Botfield M.C., Schlessinger J. (1995) Measurement of the binding of tyrosyl phosphopeptides to SH2 domains: a reappraisal. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 3199-203.
192. Vély, F., Trautmann, A., Vivier, E. (2000) BIAcore analysis to test phosphopeptide-SH2 domain interactions. *Meth. Mol. Biol.*, 121, 313-321.
193. Morelock M.M., Ingraham R.H., Betageri R., Jakes S. (1995) Determination of receptor-ligand kinetic and equilibrium binding constants using surface plasmon resonance: application to the lck SH2 domain and phosphotyrosyl peptides. *J. Med. Chem.* 38, 1309-1318.
194. Biskup C., Bohmer A., Pusch R., Kelbauskas L., Gorshokov A., Majoul I., Lindenau J., Benndorf K., Bohmer F.D. (2004) Visualization of SHP-1-target interaction. *J. Cell Sci.* 117, 5165-5178.
195. Langmuir, I. (1916) The constitution and fundamental properties of solids and liquids. Part I. Solids. *J. Am. Chem. Soc.* 38, 2221-2295.
196. Poulin B., Sekiya F., Rhee S.G., (2000) Differential roles of the Src homology 2 domains of phospholipase C-gamma1 (PLC-gamma1) in platelet-derived growth factor-induced activation of PLC-gamma1 in intact cells. *J. Biol. Chem.* 275, 6411-6416.
197. Hart, C.P., Martin, J.E., Reed, M.A., Keval, A.A., Pustelnik, M.J., Northrop, J.P., Patel, D.V., Grove, J.R. (1999) Potent inhibitory ligands of the GRB2 SH2 domain from recombinant peptide libraries. *Cell Signal.*, 11, 453-464.
198. Bradshaw, J.M., Gruzca, R.A., Ladbury, J.E., Waksman, G. (1998) Probing the "two-pronged plug two-holed socket" model for the mechanism of binding of the Src SH2 domain to phosphotyrosyl peptides: a thermodynamic study. *Biochemistry*, 37, 9083-9090.
199. Perin (1926) Polarisation de la lumière de fluorescence. Vie moyenne des molécules dans l' état excité. *J. Phys. Radiat.* 1, 390-401.
200. Lakowicz J.R. (1999), Principles of Fluorescence Spectroscopy, Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York 2nd edition, Seite 291-318.
201. Schmidt, W. (2000), Optische Spektroskopie, Wiley-VCH, Weinheim 2.Auflage, Seite 212-223.
202. Lynch, B.A., Loiacono, K.A., Tiong, C.L., Adams, S.E., MacNeil, I.A.(1997) A fluorescence polarization based Src-SH2 binding assay. *Anal. Biochem.* 247, 77-82.
203. Cheng, Y.C., Prusoff, W. (1973) Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 % inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* 22, 3099-3108.
204. Nam, N.H., Pitts, R.L., Sun, G., Sardari, S., Tiemo, A., Xie, M., Yan, B., Parang, K. (2004) Design of tetrapeptide ligands as inhibitors of the Src SH2 domain. *Bioorg. Med. Chem.*, 12, 779-87.
205. Nam, N.H., Ye, G., Sun, G., Parang, K. (2004) Conformationally constrained peptide analogues of pTyr-Glu-Glu-Ile as inhibitors of the Src SH2 domain binding. *J. Med. Chem.*, 47, 3131-314.
206. Lung, F.D., Tsai, J.Y., Wie, S.Y., Cheng, J.W., Chen, C., Li, P., Roller, P.P. (2002) Novel peptide inhibitors for Grb2 SH2 domain and their detection by surface plasmon resonance. *J. Pept. Res.* 60, 143-149.
207. Bradshaw JM, Mitaxov V, Waksman G. (1999) Investigation of phosphotyrosine recognition by the SH2 domain of the Src kinase. *J Mol Biol.*, 293, 971-85.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke Prof. Dr. F.-D. Böhmer und Prof. Dr. S. Reißmann für die Bereitstellung des sehr interessanten Themas, für konstruktive Diskussionen und gute Zusammenarbeit.

Prof. Dr. T. Heinzl danke ich für die guten Arbeitsbedingungen und die Übernahme der Gutachtertätigkeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. D. Imhof. Sie stand mir stets mit Rat und Erfahrung zur Seite, wenn es um die Planung und die Durchführung der Experimente ging und half durch wertvolle Diskussionen bei der Interpretation der Ergebnisse.

Desweiteren möchte ich allen Mitarbeitern des Institutes für Biochemie und Biophysik der Friedrich-Schiller-Universität Jena, insbesondere Dr. S. Müller sowie Frau I. Kaufhold, für ihre hilfreiche Unterstützung sowie das angenehme Arbeitsklima danken.

Für die Bereitstellung und Nutzung des BIAcore 2000 danke ich Prof. Dr. F. Große (AG Biochemie, FLI Jena). Seinen Mitarbeitern Dr. Schlott und Frau Wilitzer gebührt Dank für die Einweisung in die BIAcore-Technologie.

Für die Durchführung der Modellierungsstudien danke ich Prof. Dr. M. Zacharias und Dr. K. Wieligmann.

Danken möchte ich auch der Firma BMG Labtech, besonders Dr. B. Hippler, für die Bereitstellung des POLARstar Optima.

Nicht zuletzt gilt der Dank meiner Familie für ihre unermüdliche Geduld und moralische Unterstützung

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Jena, den 6. Juli 2006

Kornelia Hampel

Erklärung zur Bewerbung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit an keiner anderen Hochschule um den akademischen Grad Doctor rerum naturalium beworben habe und dass ich weder früher noch gegenwärtig die Eröffnung eines Verfahrens zum Erwerb des oben genannten akademischen Grades an einer anderen Hochschule beantragt habe. Die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen-Fakultät der Friedrich-Schiller Universität Jena ist mir bekannt.

Jena, den 6. Juli 2006

Kornelia Hampel

Lebenslauf

Name: Kornelia Hampel, geb. Seiwert
Geburtsdatum: 08.11.1979
Geburtsort: Leipzig
Familienstand: verheiratet

9/1986-7/1992 Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule
„Karl-Jungbluth“, Leipzig

9/1992-7/1998 Theodor-Mommsen-Gymnasium, Leipzig
Abschluss: Abitur

9/1998-6/2003 Studium der Ernährungswissenschaften, Biologisch-
Pharmazeutische Fakultät, Friedrich-Schiller-Universität Jena

11/2002-5/2003 Anfertigung der Diplomarbeit am Lehrstuhl
„Ernährungsphysiologie“ der Biologisch-Pharmazeutischen
Fakultät, Friedrich-Schiller-Universität Jena

6/2003 Hochschulabschluss als Diplomernährungswissenschaftlerin
(Dipl. troph.)

6/2003- 7/2006 Doktorarbeit am Institut für Biochemie und Biophysik unter
Leitung von Prof. Dr. T. Heinzl/Prof. Dr. S. Reißmann

6/2003-6/2005 Förderung durch den SFB 604 „Multifunktionelle
Signalproteine“, Teilprojekt A1, Leitung: Prof. Dr. F.-D.
Böhmer

7/2005-6/2006 Förderung durch die Friedrich-Schiller-Universität Jena

Jena, den 6. Juli 2006

Kornelia Hampel