

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
5. Januar 2006 (05.01.2006)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2006/000213 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:
C07K 14/47 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2005/001181

(22) Internationales Anmeldedatum:
29. Juni 2005 (29.06.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2004 031 579.5 29. Juni 2004 (29.06.2004) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): **FORSCHUNGSVERBUND BERLIN E.V.**
[DE/DE]; Rudower Chaussee 17, 12489 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **KLUSSMANN, Enno**
[DE/DE]; Parallelstr. 14 B, 12209 BERLIN Berlin (DE).
ROSENTHAL, Walter [DE/DE]; Machnower Busch 7,
14532 Kleinmachnow (DE). **HUNDSRUCKER, Chris-**
tian [DE/DE]; Katzbachstr. 10, 10965 Berlin (DE).

(74) Anwalt: **LANGE, Sven**; HERTIN Anwaltssozietät, 54/55
Kurfürstendamm, 10707 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KP, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM,
PG, PH, PL, PT, RO, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA,
ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL,
PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: PEPTIDES FOR INHIBITING THE INTERACTION OF PROTEIN KINASE A AND PROTEIN KINASE A AN-
CHOR PROTEINS

(54) Bezeichnung: PEPTIDE ZUR INHIBITION DER INTERAKTION VON PROTEINKINASE A UND PROTEINKINASE
A-ANKERPROTEINEN

(57) Abstract: The invention relates to a nucleic acid sequence that codes for peptides which inhibit the interaction of protein
kinase A (PKA) and protein kinase A-anchor proteins (AKAP), a host organism, which has the nucleic acid sequence and, optionally,
expresses the peptides. The invention also relates to the use of the peptides and of the host organism when studying diseases, which
are associated with the AKAP PKA interaction, and to the use of the peptides as a pharmaceutical agent for treating diseases of this
type.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine Nukleinsäuresequenz, die für Peptide kodiert, die die Interaktion von Pro-
teinkinase A (PKA) und Proteinkinase A-Ankerproteinen (AKAP) inhibiert, einen Wirtsorganismus, der die Nukleinsäuresequenz
umfasst und gegebenenfalls die Peptide exprimiert sowie die Verwendung der Peptide sowie des Wirtsorganismus bei der Untersu-
chung von Krankheiten, die mit der AKAP PKA Interaktion assoziiert sind sowie die Verwendung der Peptide als pharmazeutisches
Mittel für die Behandlung solcher Krankheiten.

WO 2006/000213 A2

Peptide zur Inhibition der Interaktion von Proteinkinase A
und Proteinkinase A-Ankerproteinen

Die Erfindung betrifft Nukleinsäuresequenzen, die für Peptide kodieren, die die Interaktion von Proteinkinase A (PKA) und Proteinkinase A-Ankerproteinen (AKAP) inhibieren, einen Wirtsorganismus, der die Nukleinsäuresequenz umfasst und die erfindungsgemäßen Peptide exprimiert sowie die Verwendung der Peptide sowie des Wirtsorganismus bei der Therapie und experimentellen Untersuchung von Krankheiten, die mit einer modifizierten AKAP-PKA-Interaktion assoziiert sind sowie die Verwendung der Peptide als pharmazeutisches Mittel für die Behandlung solcher Krankheiten, insbesondere Diabetes insipidus, Ulcus duodeni, Hypertonie und Diabetes mellitus.

Die biologische Wirkung von Hormonen und Neurotransmittern wird über die Aktivierung von Signalkaskaden, welche den Phosphorylierungsstatus von Effektorproteinen verändern, vermittelt. An diesem reversiblen Prozess sind zwei Klassen von Enzymen beteiligt: Proteinkinasen und Phosphoproteinphosphatasen. Die Phosphorylierung erfolgt durch Kinasen, welche die Übertragung der endständigen Phosphatgruppe von ATP auf spezifische Serin- oder Threoninreste katalysieren, die Dephosphorylierung wird durch Phosphoproteinphosphatasen vermittelt. Ein Mechanismus zur Kontrolle und Regulation dieser Enzymaktivitäten ist die Kompartimentierung dieser Enzyme durch die Assoziation mit Ankerproteinen, die in der Nähe ihrer Substrate lokalisiert sind. Die Proteinkinase A (PKA) ist eine der multifunktionellen Kinasen mit einer breiten Substratspezifität, welche durch die so genannten *protein*

kinase A anchoring proteins (AKAPs) an subzellulären Strukturen verankert wird.

Bei vielen wichtigen zellulären Prozessen wie Kontraktion, Sekretion, Stoffwechsel, Gentranskription, Zellwachstum und -teilung erfolgt die Weiterleitung extrazellulärer Signale über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, das G-Protein G_s , Aktivierung einer Adenylylzyklase und Bildung des *secondmessenger* zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP). Die Effekte von cAMP werden durch die cAMP-abhängige PKA vermittelt.

Das Proteinkinase A (PKA)-Holoenzym besteht aus einem Dimer regulatorischer (R) Untereinheiten, an die jeweils eine katalytische (C) Untereinheit gebunden ist. Die Aktivierung der Kinase durch die Bindung von zwei Molekülen cAMP an jede R-Untereinheit induziert die Dissoziation der C-Untereinheiten, die die in ihrer Nähe befindlichen Substrate phosphorylieren. Entsprechend dem Vorhandensein von Typ I (RI) oder Typ II (RII) regulatorischen Untereinheiten wird das PKA-Holoenzym als Typ I- oder Typ II-PKA bezeichnet. Bei den RI-Untereinheiten existieren $RI\alpha$ und $RI\beta$, bei den RII-Untereinheiten $RII\alpha$ und $RII\beta$ und bei den C-Untereinheiten $C\alpha$, $C\beta$ und $C\gamma$. Die unterschiedlichen PKA-Untereinheiten werden von verschiedenen Genen kodiert (Klussmann, 2004; Tasken und Aandahl, 2004).

Die regulatorischen Untereinheiten zeigen ein unterschiedliches Expressionsmuster. Während $RI\alpha$ und $RII\alpha$ ubiquitär in den Geweben vorkommen, ist die regulatorische Untereinheit $RI\beta$ in erster Linie im Gehirn zu finden.

Die Assoziation der beiden R-Untereinheiten mit intrazellulären Kompartimenten wird durch AKAPs vermittelt. Bei den Ankerproteinen handelt es sich um eine Gruppe

funktionell verwandter Moleküle, die durch die Interaktion mit Typ I bzw. Typ II der regulatorischen Untereinheiten (RI bzw. RII) des PKA-Holoenzym charakterisiert sind. Die ersten Ankerproteine wurden bei der affinitätschromatographischen Reinigung der R-Untereinheiten über cAMP-Sepharose isoliert. Diese assoziierten Proteine zeigten auch nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran eine RII-Bindung. Auf dieser Beobachtung beruht auch die gebräuchlichste Methode (RII-overlay) zur Detektion von AKAPs. Es handelt sich hierbei um einen modifizierten Western Blot, bei dem statt eines primären Antikörpers radioaktiv markierte RII-Untereinheiten als Sonde eingesetzt werden.

Zur funktionellen Bedeutung der RI-AKAP-Interaktion ist noch wenig bekannt. Auch wenn RI α hauptsächlich zytosolisch lokalisiert ist, zeigen verschiedene Studien eine Verankerung *in vivo*. Dabei scheint die dynamische Verankerung der RI α -Untereinheiten im Gegensatz zur statischen Verankerung der RII-Untereinheiten von entscheidender Bedeutung für die Zelle zu sein. So wurde die Assoziation der RI-Untereinheiten mit der Plasmamembran von Erythrozyten und aktivierten T-Lymphozyten beschrieben. Bei der cAMP-vermittelten Inhibition der T-Zell-Proliferation durch die PKA Typ I könnte die Lokalisation des Enzyms möglicherweise auch durch AKAPs vermittelt werden. In *knockout*-Mäusen, die im Skelettmuskelgewebe keine regulatorischen Untereinheiten Typ II exprimieren, binden die RI α -Untereinheiten an ein mit Kalziumkanälen assoziiertes AKAP und erhalten so die normale, cAMP-abhängige Kanalleitfähigkeit durch die korrekte Verfügbarkeit der katalytischen Untereinheiten der PKA.

In vivo konnte weiterhin gezeigt werden, dass die katalytischen Untereinheiten in der Zelle bevorzugt mit den

RII-Untereinheiten assoziieren und Typ I-PKA-Holoenzym gebildet wird, wenn die Menge der freien katalytischen Untereinheiten die Menge der freien RII-Untereinheiten übersteigt.

Die Spezifität in der PKA-Verankerung wird durch die *targeting*-Domäne erreicht, ein Strukturmotiv, das im Gegensatz zu der *anchoring*-Domäne weder in der Sequenz noch in der Struktur der AKAPs konserviert ist. So werden AKAPs durch Protein-Protein-Interaktionen an strukturelle Elemente in der Zelle und durch Protein-Lipid-Interaktionen an Membranen verankert.

In der Literatur sind verschiedene AKAPs beschrieben, die mit unterschiedlichen zellulären Kompartimenten assoziieren, so zum Beispiel mit den Zentrosomen, den Mitochondrien, dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat, der Plasma- und Kernmembran und mit Vesikeln.

Die genauen Mechanismen der Verankerung sind bisher nur für einige AKAPs bekannt. So wird das herzmuskelspezifische Ankerprotein mAKAP durch eine Region mit drei spektrinartigen Wiederholungssequenzen an der perinukleären Membran der Kardiomyozyten verankert. Zwei Isoformen der AKAP15/18 werden durch Lipidmodifikationen (Myristoylierung und Palmitoylierung) an der Plasmamembran verankert. Drei polybasische Regionen in der *targeting*-Domäne des AKAP79 sind an der Lokalisation des Proteins an der inneren postsynaptischen Membran (PSD, *postsynaptic density*) beteiligt.

Die AKAPs wurden zuerst durch die Interaktion mit der PKA charakterisiert. Einige dieser Proteine können jedoch auch andere an der Signaltransduktion beteiligte Enzyme binden.

Durch die gleichzeitige Verankerung von Enzymen, die gegensätzliche Reaktionen katalysieren, wie zum Beispiel Kinasen und Phosphatasen, können diese, auch als *scaffolding* (gerüstbildende) Proteine bezeichneten AKAPs ganze Signalkomplexe in der Nähe bestimmter Substrate lokalisieren und so zur Spezifität und Regulation der zellulären Antwort auf extrazelluläre Signale beitragen. AKAP79 war das erste AKAP, für das die Interaktion mit mehreren Enzymen nachgewiesen werden konnte. Dieses Protein bindet die Proteinkinase A, die Proteinkinase C und die Proteinphosphatase Calcineurin (PP2B), wobei jedes Enzym in gebundenem Zustand inhibiert ist. Da unterschiedliche Signale für die Aktivierung jedes einzelnen Enzyms notwendig sind, können an dieser Stelle verschiedene *second messenger* wie cAMP, Kalzium und Phospholipide zusammentreffen. Weitere Beispiele sind das AKAP220, welches die PKA und die Proteinphosphatase PP1 an den Peroxisomen lokalisiert und das AKAP Yotiao, das neben der PKA ebenfalls die Proteinphosphatase PP1 bindet. Das AKAP CG-NAP bindet nicht nur die PKA und die Proteinphosphatase PP1, sondern auch noch die Rho-abhängige Kinase PKN (NGF (nerve growth factor) -aktivierte Proteinkinase) und die Proteinphosphatase PP2A.

Auch andere Proteine können mit AKAPs assoziieren, so bindet Ezrin, ein Mitglied der zytoskelett-assoziierten ERM-Familie Ezrin, Radixin und Moesin, das als AKAP identifiziert wurde, an ein Protein (EBP50/NHERF), welches an der Regulation des Natrium-Protonen-Transportes in der apikalen Membran von Epithelzellen beteiligt ist. AKAPs vermitteln die Modulation der Leitfähigkeit der Ionenkanäle durch die Lokalisation der Proteinkinasen und -phosphatasen in der Nähe bestimmter Kanaluntereinheiten, die wahrscheinlich durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert werden.

Die Aktivität des NMDA-Rezeptors wird durch das AKAP Yotiao, welches auch die Proteinphosphatase PP1 bindet, moduliert. Die in gebundenem Zustand aktive Phosphatase limitiert die Kanalleitfähigkeit des NMDA-Rezeptors, bis die PKA durch cAMP aktiviert wird und den Ionenkanal oder ein assoziiertes Protein phosphoryliert, wodurch die Leitfähigkeit rapide ansteigt. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass myristoylierte Ht31-Peptide, die die Interaktion zwischen PKA und AKAP inhibieren, die cAMP-abhängige Inhibition der Interleukin 2-Transkription in Jurkat-T-Zellen aufheben und dass S-Ht31-Peptide die Spermienmotilität einschränken.

Auch bei den wichtigen komplexen biologischen Prozessen, wie die durch das Hormon GLP-1 (*glucagon-like peptide*)-vermittelte Verstärkung der Insulinsekretion in den β -Zellen des Pankreas und in RINm5F-Zellen (klonale β -Zelllinie der Ratte) sind AKAPs beteiligt. Die Aktivierung der PKA durch GLP-1 führt zur Phosphorylierung von L-Typ-Kalziumkanälen und begünstigt die Exozytose von Insulin aus sekretorischen Granula. Die Ht31-Peptid-vermittelte Inhibition der PKA-Verankerung führte zu einer deutlichen Verringerung der Insulinsekretion. Dabei wurden weder die cAMP-Bildung noch die Aktivität der katalytischen Untereinheiten der PKA durch die Peptide beeinflusst. Weiterhin konnte nach Expression des wildtypischen AKAP18 α in RINm5F-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen, welche AKAP18 α nicht exprimierten, eine Erhöhung der Insulinsekretion nach GLP-1-Applikation nachgewiesen werden.

Die vom antidiuretischen Hormon Arginin-Vasopressin (AVP)-abhängige Umverteilung des Wasserkanals Aquaporin-2 aus intrazellulären Vesikeln in die Plasmamembran von Hauptzellen des renalen Sammelrohres, die molekulare Basis

der Vasopressin-vermittelten Wasserrückresorption, ist ein weiteres Beispiel für einen Prozess, der die Interaktion der PKA mit AKAP-Proteinen erfordert (Klussmann et al., 1999). Wird die Interaktion unterbunden, kann die Umverteilung nicht stattfinden. Die Interaktion spielt jedoch auch bei zahlreichen anderen Vorgängen in einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen eine wichtige Rolle, zum Beispiel erhöht die Interaktion die Herzmuskelkontraktilität (Hulme et al., 2003).

Um die Wirkung der PKA-AKAP-Interaktion zu analysieren, ist es erforderlich, die Interaktion effizient und selektiv zu modifizieren, insbesondere zu inhibieren bzw. zu entkoppeln. Derzeit steht für die Entkopplung der PKA von AKAP-Proteinen ein Ht31 Peptid zur Verfügung. Das Peptid Ht31 kann an Stearat gekoppelt werden, um membranpermeabel vorzuliegen. Das Peptid Ht31 entkoppelt PKA und AKAP jedoch in einer Weise, die für viele Untersuchungen oder gar für eine therapeutische Verwendung nicht ausreichend ist. Vor allem ist das Peptid Ht31 nicht in der Lage, selektiv mit den regulatorischen Untereinheiten $RII\alpha$ oder $RII\beta$ der PKA zu interagieren, so dass die Bedeutung der Untereinheiten für ausgewählte Prozesse nicht analysiert werden kann.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, die genannten Nachteile zu überwinden und insbesondere neue Nukleinsäuresequenzen bereitzustellen, die für Peptide kodieren, die die Interaktion von AKAP und PKA effizient und spezifisch modifizieren, insbesondere entkoppeln und die weiterhin als überexpremierende Stoffe in Wirtsorganismen eingesetzt werden können, um mit Hilfe dieser Wirtsorganismen - beispielsweise von Mäusen - modellhaft Krankheiten zu analysieren, die mit der AKAP-PKA-Interaktion assoziiert sind, vorzugsweise Diabetes insipidus, aber auch Ulcus duodeni, Hypertonie und Diabetes mellitus.

Die vorliegende Erfindung löst dieses technische Problem durch die Bereitstellung einer isolierten Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe umfassend

- a) ein Nukleinsäuremolekül umfassend eine Nukleotidsequenz kodierend mindestens eine Aminosäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe umfassend SEQ ID Nr. 1 - 39,
- b) ein Nukleinsäuremolekül, welches mit einer Nukleotidsequenz gemäß a) unter stringenten Bedingungen hybridisiert,
- c) ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine Nukleotidsequenz, die eine ausreichende Homologie aufweist, um zu einer Nukleotidsequenz gemäß a) oder b) funktionsanalog zu sein,
- d) ein Nukleinsäuremolekül, das infolge des genetischen Codes zu einer Nukleotidsequenz gemäß a) - c) degeneriert ist und/oder
- e) ein Nukleinsäuremolekül gemäß einer Nukleotidsequenz nach a) - d), welches durch Deletionen, Additionen, Substitutionen, Translokationen, Inversionen und/oder Insertionen modifiziert und funktionsanalog zu einer Nukleotidsequenz gemäß a) bis d) ist.

Es war überraschend, dass die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen eingesetzt werden können, um Peptide gemäß Tab. 1 (SEQ ID Nr. 1 - 39) zu kodieren, die die Wechselwirkung von AKAP und PKA modifizieren, vorzugsweise inhibieren, besonders bevorzugt entkoppeln. Mit Vorteil eignen sich die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle zur Kodierung von Peptiden, die selektiv an regulatorische Untereinheiten der PKA binden, insbesondere an RII α bzw. RII β . Weiterhin ermöglichen es die - durch die

erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle kodierten - Peptide, eine Modifizierung, Inhibition bzw. Entkopplung von AKAP und PKA in Abhängigkeit der verwendeten Spezies vorzunehmen. Die Nukleinsäuremoleküle bzw. die aus diesen abgeleiteten Peptide eignen sich mit Vorteil zur Herstellung transgener Organismen, beispielsweise von Mäusen, in denen die AKAP-PKA-Interaktion gewebs- und/oder zellspezifisch modifiziert ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die Nukleinsäuresequenz, die eine ausreichende Homologie aufweist, um zu einer Nukleotidsequenz funktionsanalog zu sein, zumindest zu 40 % homolog. Im Sinne der Erfindung heißt, um zu den genannten Nukleinsäuresequenzen bzw. den mit diesen Nukleinsäuresequenzen hybridisierenden Sequenzen funktionsanalog zu sein, dass die kodierten homologen Strukturen eine effiziente und selektive Entkoppelung der PKA-AKAP-Interaktion ermöglichen und eine hohe Affinität für die Bindung an RII-Untereinheiten von PKA besitzen.

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung weist das Nukleinsäuremolekül mindestens 60 %, vorzugsweise 70 %, bevorzugt 80 %, ganz besonders bevorzugt 90 % Homologie zu den erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekülen auf.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Nukleinsäuremolekül eine genomische DNA und/oder eine RNA; besonders bevorzugt ist das Nukleinsäuremolekül eine cDNA.

Die Erfindung betrifft auch einen Vektor, der mindestens ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül umfasst. Weiterhin betrifft die Erfindung auch eine Wirtszelle, die den Vektor umfasst. Die Erfindung betrifft auch ein

Polypeptid, das durch mindestens ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül kodiert wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfasst das Polypeptid eine Aminosäuresequenz nach SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 39, bzw. mindestens ein Polypeptid gemäß dieser Sequenzen. Die Erfindung betrifft auch ein Polypeptid, welches durch Deletion, Addition, Substitution, Translokation, Inversion und/oder Insertion modifiziert ist und funktionsanalog zu einem Polypeptid nach SEQ ID Nr. 1 bis 39 ist und/oder ein Polypeptid, welches ein Polypeptid umfasst, das eine ausreichende Homologie aufweist, um zu einem Polypeptid nach SEQ ID Nr. 1 bis 39 oder deren Mutationen (Deletion, Addition, Substitution, Translokation, Inversion und/oder Insertionen) funktionsanalog zu sein.

Folgende erfindungsgemäße Peptide sind besonders bevorzugt:

- SEQ ID Nr. 1 PEDAEVLRLSKRLVENAVLKAVQQY (Akap18 δ -wt)
- SEQ ID Nr. 2 PEDAELVRTSKRLVENAVLKAVQQY (AKAP18 δ -L304T)
- SEQ ID Nr. 3 PEDAEVLRLSKRDVENAVLKAVQQY (AKAP18 δ -L308D)
- SEQ ID Nr. 4 PEDAEVLRLSKRLVENAVEKAVQQY (AKAP18 δ -L314E)
- SEQ ID Nr. 5 PEDAEVLRLSKRLPENAVLKAVQQY (AKAP18 δ -P)
- SEQ ID Nr. 6 PEDAEVLRLSKRLPENAPLKAVQQY (AKAP18 δ -PP)
- SEQ ID Nr. 7 PEDAEVLRLDKRLPENAPLKAVQQY (AKAP18 δ -phos)
- SEQ ID Nr. 8 EPEDAEVLRLSKRLVENAVLKAVQQYLEETQ (Akap18 δ -RI)
- SEQ ID Nr. 9 NTDEAQEELAWKIAKMIVSDIMQQA
- SEQ ID Nr. 10 VNLDKKAVLAEKIVAEAEIEKAEREL
- SEQ ID Nr. 11 NGILELETKSSKLVQNIIQTAVDQF
- SEQ ID Nr. 12 TQDKNYEDELTOVALALVEDVINYA
- SEQ ID Nr. 13 LVDDPLEYQAGLLVQNAIQQAIAEQ
- SEQ ID Nr. 14 QYETLLIETASSLVKNAIQLSIEQL
- SEQ ID Nr. 15 LEKQYQEQLLEEEVAKVIVSMSIAFA

SEQ ID Nr. 16 EEGLDRNEEIKRAAFQIISQVISEA
SEQ ID Nr. 17 ETSAKDNINIEEAARFLVEKILVNH
SEQ ID Nr. 18 ADRGSPALSSEALVRVLVLDANDNS
SEQ ID Nr. 19 SDRGSPALSSEALVRVLVLDANDNS
SEQ ID Nr. 20 TDRGFPALSSEALVRVLVLDANDNS
SEQ ID Nr. 21 FLAGETESLADIVLWGALYPLLQDP
SEQ ID Nr. 22 SELLKQVSAAASVVSQALHDLLQHV
SEQ ID Nr. 23 EKESLTEEEATEFLKQILNGVYYLH
SEQ ID Nr. 24 EKGYYSERDAADAVKQILEAVAYLH
SEQ ID Nr. 25 WLYLQDQNKAAADAVGEILLSLSYLP
SEQ ID Nr. 26 LKISPVAPDADAVAAQILSLLPLKF
SEQ ID Nr. 27 SKTEQPAALALDLVNKL VYWDLYL
SEQ ID Nr. 28 VLASAYTGRLSMAAADIVNFLT VGS
SEQ ID Nr. 29 VKLSNLSNLSHDLVQE AIDHAQDLQ
SEQ ID Nr. 30 APSDPDAVS AEEALKYLLHLVDVNE
SEQ ID Nr. 31 QMKAKRTKEAVEVLKKALDAISHSD
SEQ ID Nr. 32 KDKLKPGAAEDDLVLEV VIMIGTVS
SEQ ID Nr. 33 EKR VADPTLEKYVLSV VLDTIN AFF
SEQ ID Nr. 34 QENLSLIGVANVFLES LFYDVKLQY
SEQ ID Nr. 35 HQSVVYRKQAAMILNELVTGAAGLE
SEQ ID Nr. 36 QQLQKQLKEAEQILATAVYQAKEKL
SEQ ID Nr. 37 HSVMDTLAVALRVAEEAIEEAISKA
SEQ ID Nr. 38 RQVQETLNLEPDVAQHLLAHSHWGA
SEQ ID Nr. 39 DIPSADRHKSKLIAGKIIPAIATTT.

Die erfindungsgemäßen Peptide sind entweder (i) von AKAP18(delta) abgeleitet (SEQ ID Nr. 1 bis 7) oder aber (ii) von Proteinen, die nicht mit AKAP-Molekülen assoziiert sind (SEQ ID Nr. 8 bis 39).

Gemeinsam ist den Peptiden gemäß (i):

Akap18 δ -wt

AKAP18 δ -L304T

AKAP18 δ -L314E

Akap18 δ -RI

dass sie die RIIalpha Untereinheiten der PKA so stark wie kein anderes, von natürlichen AKAPs abgeleitetes Peptid binden. Dies wird von uns durch die Bindung über Wasserstoffbrücken (H-Brücken) zwischen Peptid und RII-dimer erklärt (s. Abb. Wasserstoffbrücken durch gestrichelte Linien dargestellt). Entsprechend ist den Peptiden die Mindestanzahl (8) an H-Brücken bildenden Aminosäuren gemein.

Die folgenden Peptide sind ebenfalls von AKPA18(delta) abgeleitet, zeichnen sich jedoch dadurch aus, daß sie trotz hoher Aminosäureähnlichkeit keine RII-Untereinheiten der PKA binden (Negativkontrollen; notfalls kann auf eine Patentierung verzichtet werden). Gemein ist ihnen, daß sie aufgrund struktureller (1,2) oder aufgrund von Ladungsunterschieden (3,4) nicht mehr binden.

1 AKAP18 δ -P

2 AKAP18 δ -PP

3 AKAP18 δ -L308D

4 AKAP18 δ -phos

Die erfindungsgemäßen Peptide, die von anderen Proteinen als AKAPs abgeleitet sind, besitzen eine definierte Größe, die überraschenderweise zu der Fähigkeit der Peptide, eine Interaktion zwischen AKAP und PKA zu modifizieren, beiträgt, da sie die Affinität der Peptide zu den RII(alpha) Untereinheiten der PKA beeinflusst. Die Peptide bestehen aus 25 Aminosäuren und sind dem gemäß 25mere.

Werden die Peptide so ausgewählt, dass die kürzer oder länger sind (z.B. 17mere), wird ihre Aktivität hierdurch geändert. Das gemeinsame strukturelle Merkmal der Länge der Peptide definiert zusammen mit dem funktionellen Merkmal der AKAP/PKA-Entkopplung die erfindungsgemäßen Strukturen. Diese erfindungsgemäßen Peptide sind charakterisiert durch die allgemeine Formel:

xxxxxxxxx[AVLISE]xx[AVLIF][AVLI]xx[AVLI][AVLIF]xx[AVLISE]xx
xx

wobei x eine beliebige Aminosäure repräsentiert; insbesondere ist durch x dabei repräsentiert jeweils eine beliebige der 20 biogenen Aminosäuren (im Ein-Buchstaben-Code dargestellt sind dies: A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y). Beansprucht ist jede Aminosäure, die im Alberts et al. (2004) Molekularbiologie der Zelle, S. 8, 73, 79 ff., 150 ff. oder 1717G, im Römpp (1999) Biotechnologie und Gentechnik, S. 45 ff, bzw. im Römpp (2000) Lexikon Biochemie und Molekularbiologie, S. 28 ff, oder in einem anderen Standardwerk der Biologie offenbart ist. Diese besonders bevorzugten Peptide besitzen entweder eine positiv geladene Aminosäure (H, K oder R) in erster oder zweiter Position (Position ist die Nummer der Aminosäure vom N-terminus) oder Leucin in den Positionen 19, 18 oder 14 oder Serin in Position 4.

Ein funktionsanaloges Peptid ist ein Peptid, das in der Lage ist, die PKA-AKAP-Interaktion zu modifizieren, bevorzugt zu entkoppeln.

Die Erfindung betrifft auch einen Organismus, der ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül überexprimiert bzw.

einen erfindungsgemäßen Vektor umfasst und/oder ein erfindungsgemäßes Polypeptid aufweist. Hierbei kann es sich zum Beispiel um eine transgene Maus oder Ratte bzw. um ein Rind, Pferd, Esel, Schaf, Kamel, Ziege, Schwein, Kaninchen, Meerschwein, Hamster, Katze, Affe oder Hund handeln, in der gewebs- und/oder zellspezifisch die PKA-AKAP-Interaktion gestört ist. Derartige Organismen, beispielsweise Mäuse, können insbesondere verwendet werden, um Pharmaka zu entwickeln, die die PKA-AKAP-Interaktion modifizieren, bevorzugt entkoppeln.

Mittels der erfindungsgemäßen Organismen können auch in vivo Stoffwechselprozesse untersucht werden, bei denen die PKA-AKAP-Interaktion eine Rolle spielt oder bei denen geklärt werden soll, ob bei einem bestimmten Ereignis die AKAP-PKA-Interaktion involviert ist.

Bevorzugt handelt es sich bei dem Organismus um eine transgene Maus, die das stark bindende Peptid AKAP18 δ -L304T oder AKAP18 δ -L314E spezifisch in den Hauptzellen von Sammelrohren der Niere überexprimiert. Vorteilhafterweise führt die Entkoppelung der PKA von AKAP-Proteinen dazu, dass in primär kultivierten Sammelrohrzellen die Vasopressin-induzierte Umverteilung von AQP2 verhindert wird, wodurch die Tiere insbesondere einen Diabetes insipidus aufweisen. Diese Erkrankung zeichnet sich durch großen Wasserverlust (Polyurie) aus, den beispielsweise humane Patienten durch die Aufnahme größerer Mengen Flüssigkeit zu kompensieren versuchen (Polydipsie).

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen transgenen Organismen kann beispielsweise untersucht werden, wie die Entkoppelung der PKA bzw. von ausgewählten Untereinheiten von AKAP-Proteinen als therapeutisches Prinzip angesehen und genutzt werden kann. In der Folge derartiger Untersuchungen können dann

vorteilhafterweise optimierte Substanzen (Pharmaka) analysiert werden, die ebenso wirken. Derart optimierte Substanzen wirken bevorzugt als Aquaretika und können daher mit Vorteil bei Patienten mit Ödemen, beispielsweise bei Herzinsuffizienz oder bei Lebercirrhose, eingesetzt werden.

Die Erfindung betrifft auch ein Erkennungsmolekül, das gegen das Nukleinsäuremolekül, den Vektor, die Wirtszelle und/oder das Polypeptid gerichtet ist. Erkennungssubstanzen im Sinne der Erfindung sind Moleküle, die mit den genannten Strukturen wie Nukleinsäuremolekülen oder -sequenzen, Vektoren, Wirtszellen und/oder Polypeptiden bzw. deren Fragmenten wechselwirken können; insbesondere so wechselwirken, dass eine Detektion bzw. eine Manipulation dieser Strukturen möglich ist. Die Erkennungssubstanzen können insbesondere spezifische Nukleinsäuren sein, die an die genannten Nukleinsäuremoleküle oder Polypeptide binden, wie zum Beispiel Antisense-Konstrukte, cDNA oder mRNA-Moleküle bzw. deren Fragmente, aber auch Antikörper, Fluoreszenzmarker, markierte Kohlenhydrate oder Lipide bzw. Chelatoren. Es ist selbstverständlich auch möglich, dass die Erkennungssubstanzen nicht Proteine oder Nukleinsäuren bzw. Antikörper sind, sondern gegen diese gerichtete Antikörper. Die Erkennungssubstanzen können in solch einem Fall insbesondere sekundäre Antikörper sein.

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung ist das Erkennungsmolekül ein Antikörper, ein Antikörperfragment und/oder ein Antisensekonstrukt, insbesondere ein RNA-Interferenzmolekül.

Die Antikörper im Sinne der Erfindung binden die erfindungsgemäßen Peptide spezifisch. Die Antikörper können auch modifizierte Antikörper sein (zum Beispiel oligomere, reduzierte, oxidierte und markierte Antikörper). Der in der

vorliegenden Beschreibung verwendete Begriff Antikörper umfasst sowohl intakte Moleküle als auch Antikörper-Fragmente, wie Fab, $F(ab')_2$ und Fv, die bestimmte Epitop-Determinanten der Polypeptide binden können. Bei diesen Fragmenten ist die Fähigkeit des Antikörpers zur selektiven Bindung seines Antigens oder Rezeptors teilweise erhalten geblieben, wobei die Fragmente wie folgt definiert sind:

- (1) Fab, das Fragment, das ein monovalentes Antigen-bindungsfragment eines Antikörper-Moleküls enthält, lässt sich mittels Spaltung eines ganzen Antikörpers mit dem Enzym Papain erzeugen, wobei eine intakte leichte Kette und ein Teil einer schweren Kette erhalten werden;
- (2) das Fab'-Fragment eines Antikörper-Moleküls lässt sich mittels Behandlung eines ganzen Antikörpers mit Pepsin und anschließender Reduktion gewinnen, wobei eine intakte leichte Kette und ein Teil der schweren Kette erhalten werden; pro Antikörper-Molekül werden zwei Fab'-Fragmente erhalten;
- (3) $F(ab')_2$, das Fragment des Antikörpers, das sich mittels Behandlung eines ganzen Antikörpers mit dem Enzym Pepsin ohne anschließende Reduktion erhalten lässt; $F(ab')_2$ ist ein Dimer von zwei Fab'-Fragmenten, die durch zwei Disulfid-Bindungen zusammengehalten werden;
- (4) Fv, definiert als gentechnisch verändertes Fragment, das den variablen Bereich der leichten Kette und den variablen Bereich der schweren Kette enthält und in Form von zwei Ketten exprimiert wird; und

- (5) Einzelketten-Antikörper ("SCA"), definiert als gentechnisch verändertes Molekül, das den variablen Bereich der leichten Kette und den variablen Bereich der schweren Kette enthält, die durch einen geeigneten Polypeptid-Linker zu einem genetisch fusionierten Einzelketten-Molekül verbunden sind.

Die Erfindung betrifft auch eine pharmazeutische Zusammensetzung, die das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül, den erfindungsgemäßen Vektor, die erfindungsgemäße Wirtszelle, das erfindungsgemäße Polypeptid und/oder das erfindungsgemäße Erkennungsmolekül, gegebenenfalls zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger, umfasst.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die pharmazeutische Zusammensetzung ein Aquaretika. Aquaretika im Sinne der Erfindung modifizieren die Wechselwirkung zwischen PKA und AKAP-Proteinen, insbesondere entkoppeln sie die Wechselwirkung zwischen diesen beiden. Selbstverständlich ist es auch möglich, die erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle als pharmazeutische Zusammensetzung einzusetzen, insbesondere die, die gegen das erfindungsgemäße Peptid oder die kodierende Nukleinsäure gerichtet sind.

Insbesondere die die erfindungsgemäßen Peptide, die erfindungsgemäßen Vektoren oder die erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle umfassenden pharmazeutischen Zusammensetzungen können bevorzugt bei Patienten mit Ödemen, insbesondere bei Herzinsuffizienz oder Leberzirrhose eingesetzt werden. Die erfindungsgemäßen Vektoren bzw. Nukleinsäuremoleküle können im Sinne der Erfindung als pharmazeutische Zusammensetzung auf der Nukleinsäureebene eingesetzt werden, wohingegen die

erfindungsgemäßen Peptide, aber zum Teil auch die erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle, auf der Aminosäureebene eingesetzt werden können. Je nachdem, ob die Therapie in der Entkoppelung von AKAP und PKA - z.B. mittels der erfindungsgemäßen Peptide - bzw. in der Verhinderung der Entkoppelung zwischen AKAP und PKA - z.B. mittels der erfindungsgemäßen Antikörper gerichtet gegen die Peptide - besteht, kann der Fachmann bevorzugt die erfindungsgemäßen Peptide bzw. die erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle, die zum Beispiel gegen diese Peptide oder andere Strukturen gerichtet sind, als pharmazeutische Zusammensetzung verwenden. Die erfindungsgemäßen Peptide sind insbesondere für die Entkoppelung von AKAP/PKA einsetzbar und somit beispielsweise bei Ödemen. Die erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle (z.B. Antikörper) sind insbesondere bei der Verhinderung der Entkoppelung von AKAP/PKA einsetzbar z.B. bei Diabetes insipidus.

Selbstverständlich ist es möglich, dass die erfindungsgemäßen Peptide übliche Hilfsstoffe, bevorzugt Träger, Adjuvantien und/oder Vehikel umfassen. Bei den Trägern kann es sich beispielsweise um Füllmittel, Streckmittel, Bindemittel, Feuchthaltemittel, Sprengmittel, Lösungsverzögerer, Resorptionsbeschleuniger, Netzmittel, Adsorptionsmittel und/oder Gleitmittel handeln. In diesem Fall wird das Peptid insbesondere als Arzneimittel oder pharmazeutisches Mittel bezeichnet.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird das erfindungsgemäße Mittel als Gel, Puder, Pulver, Tablette, Retard-Tablette, Premix, Emulsion, Aufgussformulierung, Tropfen, Konzentrat, Granulat, Sirup, Pellet, Boli, Kapsel, Aerosol, Spray und/oder Inhalat zubereitet und/oder in dieser Form angewendet. Die Tabletten, Dragees, Kapseln, Pillen und Granulate können mit den üblichen,

gegebenenfalls Opakisierungsmitteln enthaltenden, Überzügen und Hüllen versehen sein und auch so zusammengesetzt sein, dass sie den oder die Wirkstoffe nur oder bevorzugt in einem bestimmten Teil des Intestinaltraktes gegebenenfalls verzögert abgeben, wobei als Einbettungsmassen zum Beispiel Polymersubstanzen und Wachse verwendet werden können.

Die Arzneimittel dieser Erfindung können beispielsweise zur oralen Verabreichung in einer beliebigen oral verträglichen Dosierungsform verwendet werden, die Kapseln, Tabletten und wässrige Suspensionen und Lösungen einschließt, aber nicht darauf beschränkt ist. Im Fall von Tabletten zur oralen Verwendung schließen Träger, die häufig verwendet werden, Lactose und Maisstärke ein. Gleitmittel, wie Magnesiumstearat, werden auch typischerweise zugesetzt. Zur oralen Verabreichung in Kapselform schließen verwendbare Verdünnungsmittel Lactose und getrocknete Maisstärke ein. Wenn wässrige Suspensionen oral verabreicht werden, wird der Wirkstoff mit Emulgier- und Suspendiermitteln kombiniert. Falls gewünscht, können bestimmte Süßmittel und/oder Geschmacksstoffe und/oder Farbmittel zugesetzt werden.

Der oder die Wirkstoffe können gegebenenfalls mit einem oder mehreren der oben angegebenen Trägerstoffe auch in mikroverkapselter Form vorliegen.

Suppositorien können neben dem oder den Wirkstoffen die üblichen wasserlöslichen oder wasserunlöslichen Trägerstoffe enthalten, zum Beispiel Polyethylenglycole, Fette, zum Beispiel Kakaofett und höhere Ester (zum Beispiel C₁₄-Alkohol mit C₁₆-Fettsäure) oder Gemische dieser Stoffe).

Salben, Pasten, Cremes und Gele können neben dem oder den Wirkstoffen die üblichen Trägerstoffe enthalten, zum Beispiel tierische und pflanzliche Fette, Wachse, Paraffine,

Stärke, Tragant, Cellulosederivate, Polyethylenglycole, Silikone, Bentonite, Kieselsäure, Talkum und Zinkoxid oder Gemische dieser Stoffe.

Puder und Sprays können neben dem oder den Wirkstoffen die üblichen Trägerstoffe enthalten, zum Beispiel Milchzucker, Talkum, Kieselsäure, Aluminiumhydroxid, Calciumsilikat und Polyamidpulver oder Gemische dieser Stoffe. Sprays können zusätzlich die üblichen Treibmittel, zum Beispiel Chlorfluorkohlenwasserstoffe, enthalten.

Lösungen und Emulsionen können neben den Wirkstoffen CHP und Gemcitabin die üblichen Trägerstoffe wie Lösungsmittel, Lösungsvermittler und Emulgatoren, zum Beispiel Wasser, Ethylalkohol, Isopropylalkohol, Ethylcarbonat, Ethylacetat, Benzylalkohol, Benzylbenzoat, Propylenglykol, 1,3-Butylenglykol, Dimethylformamid, Öle, insbesondere Baumwollsaatöl, Erdnussöl, Maiskeimöl, Olivenöl, Ricinusöl und Sesamöl, Glycerin, Glycerinformal, Tetrahydrofurfurylalkohol, Polyethylenglycole und Fettsäureester des Sorbitans oder Gemische dieser Stoffe enthalten. Zur parenteralen Applikation können die Lösungen und Emulsionen auch in steriler und blutisotonischer Form vorliegen.

Suspensionen können neben den Wirkstoffen die üblichen Trägerstoffe wie flüssige Verdünnungsmittel, zum Beispiel Wasser, Ethylalkohol, Propylenglykol, Suspendiermittel, zum Beispiel ethoxilierte Isostearylalkohole, Polyoxyethylensorbit- und Sorbitan-Ester, mikrokristalline Cellulose, Aluminiummetahydroxid, Bentonit, Agar-Agar und Tragant oder Gemische dieser Stoffe enthalten.

Die Arzneimittel können in Form einer sterilen injizierbaren Zubereitung, zum Beispiel als sterile injizierbare wässrige oder ölige Suspension, vorliegen. Diese Suspension

kann auch mit im Fachgebiet bekannten Verfahren unter Verwendung geeigneter Dispergier- oder Netzmittel (wie zum Beispiel Tween 80) und Suspendiermittel formuliert werden. Die sterile injizierbare Zubereitung kann auch eine sterile injizierbare Lösung oder Suspension in einem ungiftigen parenteral verträglichen Verdünnungs- oder Lösungsmittel, zum Beispiel als Lösung in 1,3-Butandiol, sein. Zu den verträglichen Vehikeln und Lösungsmitteln, die verwendet werden können, gehören Mannit, Wasser, Ringer-Lösung und isotonische Natriumchloridlösung. Außerdem werden üblicherweise sterile, nichtflüchtige Öle als Lösungsmittel oder Suspendiermedium verwendet. Zu diesem Zweck kann ein beliebiges mildes nichtflüchtiges Öl einschließlich synthetischer Mono- oder Diglyceride verwendet werden. Fettsäuren, wie Ölsäure und ihre Glyceridderivate sind bei der Herstellung von Injektionsmitteln verwendbar, wie es natürliche pharmazeutisch verträgliche Öle, wie Olivenöl oder Rizinusöl, insbesondere in ihren polyoxyethylierten Formen sind. Diese Öllösungen oder Suspensionen können auch einen langkettigen Alkohol oder einen ähnlichen Alkohol enthalten als Verdünnungs- oder Dispergiermittel.

Die genannten Formulierungsformen können auch Färbemittel, Konservierungsstoffe sowie geruchs- und geschmacksverbesserte Zusätze, zum Beispiel Pfefferminzöl und Eukalyptusöl und Süßmittel, zum Beispiel Saccharin, enthalten. Die erfindungsgemäßen Peptide sollen in den aufgeführten pharmazeutischen Zubereitungen vorzugsweise in einer Konzentration von etwa 0,01 bis 99,9, vorzugsweise von etwa 0,05 bis 99 Gew.-% der Gesamtmischung vorhanden sein.

Die aufgeführten pharmazeutischen Zubereitungen können außer dem Peptid oder Strukturhomologen - z.B. Peptiden mit D-Aminosäuren - oder Funktionsanalogen - z.B. Peptidmimetika - weitere pharmazeutische Wirkstoffe

enthalten. Die Herstellung der oben aufgeführten pharmazeutischen Zubereitungen erfolgt in üblicher Weise nach bekannten Methoden, zum Beispiel durch Mischen des oder der Wirkstoffe mit dem oder den Trägerstoffen.

Die genannten Zubereitungen können bei Mensch und Tier entweder oral, rektal, parenteral (intravenös, intramuskulär, subkutan), intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, lokal (Puder, Salbe, Tropfen) und zur Therapie der genannten Krankheiten angewendet werden. Als geeignete Zubereitung kommen Injektionslösungen, Lösungen und Suspensionen für die orale Therapie, Gele, Aufgussformulierungen, Emulsionen, Salben oder Tropfen in Frage. Zur lokalen Therapie können ophtalmologische und dermatologische Formulierungen, Silber- und andere Salze, Ohrentropfen, Augensalben, Puder oder Lösungen verwendet werden. Bei Tieren kann die Aufnahme auch über das Futter oder Trinkwasser in geeigneten Formulierungen erfolgen. Ferner können die Arzneimitteln oder die Kombinationsmittel in andere Trägermaterialien wie zum Beispiel Kunststoffe, (Kunststoffketten zur lokalen Therapie), Kollagen oder Knochenzement eingearbeitet werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die Peptide in einer Konzentration von 0,1 bis 99,5, bevorzugt von 0,5 bis 95, besonders bevorzugt von 20 bis 80 Gew.-% in einer pharmazeutischen Zubereitung eingebracht. Das heißt, die Peptide sind in den oben aufgeführten pharmazeutischen Zubereitungen, zum Beispiel Tabletten, Pillen, Granulaten und anderen, vorzugsweise in einer Konzentration von 0,1 bis 99,5 Gew.-% der Gesamtmischung in einem bestimmten Verhältnis vorhanden. Die Wirkstoffmenge, das heißt die Menge einer erfindungsgemäßen Verbindung, die mit den Trägermaterialien kombiniert wird, um eine einzige Dosierungsform zu erzeugen, wird von dem Fachmann in

Abhängigkeit von dem zu behandelnden Patienten und der besonderen Verabreichungsart variieren können. Nach Besserung des Zustandes des Patienten kann der Anteil der wirksamen Verbindung in der Zubereitung so geändert werden, dass eine Erhaltungsdosis vorliegt, die die Krankheit zum Stillstand bringt. Anschließend kann die Dosis oder Frequenz der Verabreichung oder beides als Funktion der Symptome auf eine Höhe verringert werden, bei der der verbesserte Zustand beibehalten wird. Wenn die Symptome auf das gewünschte Niveau gelindert worden sind, sollte die Behandlung aufhören. Patienten können jedoch eine Behandlung mit Unterbrechung auf Langzeitbasis nach beliebigem Wiederauftreten von Erkrankungssymptomen benötigen. Demgemäß ist der Anteil der Verbindungen, das heißt ihre Konzentration, in der Gesamtmischung der pharmazeutischen Zubereitung ebenso wie ihre Zusammensetzung oder Kombination variabel und kann vom Fachmann aufgrund seines Fachwissens modifiziert und angepasst werden.

Dem Fachmann ist bekannt, dass die erfindungsgemäßen Peptide mit einem Organismus, bevorzugt einem Menschen oder einem Tier, auf verschiedenen Wegen in Kontakt gebracht werden können. Weiterhin ist dem Fachmann bekannt, dass insbesondere die pharmazeutischen Mittel in verschiedenen Dosierungen appliziert werden können. Die Applikation sollte hierbei so erfolgen, dass die Erkrankung möglichst effektiv bekämpft wird bzw. der Ausbruch einer solchen Krankheit in einer prophylaktischen Gabe verhindert wird. Die Konzentration und die Art der Applikation können vom Fachmann durch Routineversuche eruiert werden. Bevorzugte Applikationen der erfindungsgemäßen Verbindungen sind die orale Applikation in Form von Pulver, Tabletten, Saft, Tropfen, Kapseln oder ähnlichem, die rektale Applikation in Form von Zäpfchen, Lösungen und ähnlichem, parenteral in

Form von Injektionen, Infusionen und Lösungen sowie lokal in Form von Salben, Pflastern, Umschlägen, Spülungen und ähnlichem. Bevorzugt erfolgt das In-Kontakt-Bringen der erfindungsgemäßen Verbindungen prophylaktisch oder therapeutisch.

Die Eignung der gewählten Applikationsformen wie auch der Dosis, des Applikationsschemas, der Adjuvantswahl und dergleichen kann beispielsweise durch Entnahme von Serum-Alliquoten aus dem Patienten, d.h. dem Mensch oder dem Tier, und dem Testen auf das Vorhandensein von Krankheitsindikatoren im Verlauf des Behandlungsprotokolls bestimmt werden. Alternativ und begleitend hierzu kann der Zustand der Niere, aber auch die Menge von T-Zellen oder anderen Zellen des Immunsystems, auf herkömmliche Weise begleitend bestimmt werden, um einen Gesamtüberblick über die immunologische Konstitution des Patienten und insbesondere die Konstitution von stoffwechselwichtigen Organen, zu erhalten. Zusätzlich kann der klinische Zustand des Patienten auf die gewünschte Wirkung hin beobachtet werden. Wenn eine unzureichende therapeutische Effektivität erzielt wird, kann der Patient mit erfindungsgemäßen Mitteln ggf. mit anderen bekannten Medikamenten modifiziert weiterbehandelt werden, von denen eine Verbesserung der Gesamtkonstitution erwartet werden kann. Selbstverständlich ist es auch möglich, die Träger oder Vehikeln des pharmazeutischen Mittels zu modifizieren oder den Verabreichungsweg zu variieren.

Neben der oralen Aufnahme kann es dann zum Beispiel vorgesehen sein, dass Injektionen beispielsweise intramuskulär oder subkutan oder in die Blutgefäße ein weiterer bevorzugter Weg für die therapeutische Verabreichung der erfindungsgemäßen Verbindungen sind. Zeitgleich kann auch die Zufuhr über Katheter oder chirurgische Schläuche angewendet

werden; beispielsweise über Katheter, die direkt zu bestimmten Organen wie den Nieren führen.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können in einer bevorzugten Ausführungsform in einer Gesamtmenge von bevorzugt 0,05 bis 500 mg/kg Körpergewicht je 24 Stunden eingesetzt werden, bevorzugt von 5 bis 100 mg/kg Körpergewicht. Hierbei handelt es sich vorteilhafterweise um eine therapeutische Menge, die verwendet wird, um die Symptome einer Störung oder respo-n-siven, pathologisch physiologischen Kondition zu verhindern oder zu verbessern.

Selbstverständlich wird die Dosis vom Alter, der Gesundheit und dem Gewicht des Empfängers, dem Grad der Krankheit, der Art einer notwendigen gleichzeitigen Behandlung, der Häufigkeit der Behandlung und der Art der gewünschten Wirkungen und der Nebenwirkungen abhängen. Die tägliche Dosis von 0,05 bis 500 mg/kg Körpergewicht kann einmalig oder mehrfach angewendet werden, um die gewünschten Ergebnisse zu erhalten. Typischerweise werden insbesondere pharmazeutischen Mittel zur etwa 1- bis 10-maligen Verabreichung pro Tag oder alternativ oder zusätzlich als kontinuierliche Infusion verwendet. Solche Verabreichungen können als chronische oder akute Therapie angewendet werden. Die Wirkstoffmengen, die mit den Trägermaterialien kombiniert werden, um eine einzelne Dosierungsform zu erzeugen, können in Abhängigkeit von dem zu behandelnden Wirt und der besonderen Verabreichungsart selbstverständlich variieren. Bevorzugt ist es, die Targets-dosis auf 2 bis 5 Applikationen zu verteilen, wobei bei jeder Applikation 1 bis 2 Tabletten mit einem Wirkstoffgehalt von 0,05 bis 500 mg/kg Körpergewicht verabreicht werden. Selbstverständlich ist es möglich, den Wirkstoffgehalt auch höher zu wählen, beispielsweise bis zu einer Konzentration bis 5000 mg/kg. Die Tabletten können auch retardiert sein, wodurch sich die

Anzahl der Applikationen pro Tag auf 1 bis 3 vermindert. Der Wirkstoffgehalt der retardierten Tabletten kann 3 bis 3000 mg betragen. Wenn der Wirkstoff - wie ausgeführt - durch eine Injektion verabreicht wird, ist es bevorzugt, 1- bis 10-mal pro Tag bzw. durch Dauerinfusion den Wirt mit den erfindungsgemäßen Verbindungen in Kontakt zu bringen, wobei Mengen von 1 bis 4000 mg pro Tag bevorzugt sind. Die bevorzugten Gesamtmengen pro Tag haben sich in der Humanmedizin und in der Veterinärmedizin als vorteilhaft erwiesen. Es kann erforderlich sein, von den genannten Dosierungen abzuweichen und zwar in Abhängigkeit von der Art und dem Körpergewicht des zu behandelnden Wirts, der Art und der Schwere der Erkrankung, der Art der Zubereitung der Applikation des Arzneimittels sowie dem Zeitraum bzw. dem Intervall, innerhalb welchem die Verabreichung erfolgt. So kann es in einigen Fällen bevorzugt sein, den Organismus mit weniger als den genannten Mengen in Kontakt zu bringen, während in anderen Fällen die angegebene Wirkstoffmenge überschritten werden muss. Die Festlegung der jeweils erforderlichen optimalen Dosierungen und der Applikationsart der Wirkstoffe kann durch den Fachmann aufgrund seines Fachwissens leicht erfolgen.

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird das pharmazeutische Mittel in einer Einzelgabe von 1 bis 100, insbesondere von 2 bis 50 mg/kg Körpergewicht eingesetzt. Wie auch die Gesamtmenge pro Tag kann auch die Menge der Einzelgabe pro Applikation von dem Fachmann aufgrund seines Fachwissens variiert werden. Die erfindungsgemäß verwendeten Verbindungen können in den genannten Einzelkonzentrationen und Zubereitungen zusammen mit dem Futter bzw. mit Futterzubereitungen oder mit dem Trinkwasser auch in der Veterinärmedizin gegeben werden. Eine Einzeldosis enthält vorzugsweise die Menge Wirkstoff, die bei einer Applikation verabreicht wird, und die gewöhn-

lich einer ganzen, einer halben Tagesdosis oder einem Drittel oder einem Viertel einer Tagesdosis entspricht. Die Dosierungseinheiten können demgemäß bevorzugt 1, 2, 3 oder 4 oder mehrere Einzeldosen oder 0,5, 0,3 oder 0,25 einer Einzeldosis enthalten. Bevorzugt wird die Tagesdosis der erfindungsgemäßen Verbindungen auf 2 bis 10 Applikationen verteilt, bevorzugt auf 2 bis 7, besonders bevorzugt auf 3 bis 5 Applikationen. Selbstverständlich ist auch eine Dauerinfusion der erfindungsgemäßen Mittel möglich.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden bei jeder oralen Applikation der erfindungsgemäßen Verbindungen 1 bis 2 Tabletten gegeben. Die erfindungsgemäßen Tabletten können mit dem Fachmann bekannten Überzügen und Hüllen versehen sein und auch so zusammengesetzt werden, dass sie den oder die Wirkstoffe nur bei bevorzugten, in einem bestimmten Teil des Wirts freigeben.

Bevorzugt ist es in einer weiteren Ausführungsform der Erfindung, dass die Peptidabschnitte gegebenenfalls miteinander assoziiert oder mit einem Träger verbunden in Liposomen eingeschlossen sind, wobei der Einschluss in Liposomen im Sinne der Erfindung nicht zwingend bedeuten muss, dass die Peptide im Inneren der Liposomen vorliegen, ein Einschluss im Sinne der Erfindung kann auch bedeuten, dass die Peptide mit der Membran der Liposomen assoziiert sind, beispielsweise so, dass diese auf der äußeren Membran verankert sind. Eine solche Darstellung der erfindungsgemäßen Peptide in oder auf den Liposomen ist vorteilhaft, wenn der Fachmann die Liposomen so auswählt, dass sie eine immunstimulierende Wirkung haben. Dem Fachmann sind aus der DE 198 51 282 verschiedene Möglichkeiten bekannt, die immunstimulierende Wirkung von Liposomen zu modifizieren. Bei den Lipiden kann es sich um einfache Lipide handeln, wie

beispielsweise Ester und Amide oder um komplexe Lipide wie zum Beispiel um Glycolipide wie Cerebroside oder Ganglioside, um Sphingolipide oder um Phospholipide.

Beispielsweise ist es möglich, einzelne oder Gruppen von Aminosäuren in den Peptiden auszutauschen, ohne dass die Aktivität der Peptide in Bezug auf die Lösung der erfindungsgemäßen Aufgabe nachteilig beeinflusst wird. Für den Austausch derartiger Aminosäuren sei auf die entsprechenden Standardwerke der Biochemie und der Genetik verwiesen.

Im Stand der Technik sind verschiedene Möglichkeiten zur Herstellung von Peptiden offenbart. Peptide, die von den erfindungsgemäßen Peptiden ausgehend mit solchen Verfahren entwickelt werden, sind von der erfindungsgemäßen Lehre mit erfasst. Eine Möglichkeit des Generierens von funktionsanalogen Peptiden ist beispielsweise in PNAS USA 1998, Oct. 13; 9521:12179-84, WO 99/6293 und/oder WO 02/38592 beschrieben; diese Lehren sind in den Offenbarungsgehalt der Erfindung mit aufgenommen. Das heißt, sämtliche Peptide, Peptidfragmente oder Strukturen, die Peptide umfassen, die mit den genannten Verfahren - von den erfindungsgemäßen Peptiden ausgehend - generiert werden, sind Peptide im Sinne der Erfindung, sofern sie die erfindungsgemäße Aufgabe lösen. Die erfindungsgemäßen Peptide sind auch Leitstrukturen für die Entwicklung von Peptidmimetika.

Dem Fachmann ist weiterhin bekannt, dass einzelne Aminosäuren analoge physikochemische Eigenschaften aufweisen, die mit Vorteil dazu führen, dass diese Aminosäuren untereinander ausgetauscht werden können. Hierzu gehören beispielsweise die Gruppe der Aminosäuren (a) Glycin, Alanin, Valin, Leucin und/oder Isoleucin; bzw. die Aminosäuren (b) Serin und Threonin, die Aminosäuren (c) Asparagin und

Glutamin, die Aminosäuren (d) Asparaginsäure und Glutaminsäure; die Aminosäuren (e) Lysin und Arginin sowie die Gruppe der aromatischen Aminosäuren (f) Phenylalanin, Tyrosin und/oder Tryptophan. Aminosäuren innerhalb ein und derselben Gruppe (a-f) können untereinander ausgetauscht werden. Weiterhin ist es möglich, dass Aminosäuren durch modifizierte Aminosäuren oder spezifische Enantiomere ausgetauscht werden. Weitere Modifikationen sind gemäß der Lehre nach der WO 99/62933 oder WO 02/38592 möglich, die in den Offenbarungsgehalt der erfindungsgemäßen Lehre mit aufgenommen sind.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst das Peptid einen Linker und/oder einen Spacer, der ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend: α -Aminocarbonsäuren sowie deren Homo- und Heterooligomere, α,ω -Aminocarbonsäuren sowie deren verzweigte Homo- oder Heterooligomere, sonstige Aminosäuren sowie die linearen und verzweigten Homo- oder Heterooligomere (Peptide); Amino-oligoalkoxy-alkylamine; Maleinimidocarbonsäure-Derivate; Oligomere von Alkylaminen; 4-Alkylphenyl-Derivate; 4-Oligoalkoxyphenyl- oder 4-Oligoalkoxyphenoxy-Derivate; 4-Oligoalkylmercaptophenyl- oder 4-Oligoalkylmercaptophenoxy-Derivate; 4-Oligoalkylaminophenyl- oder 4-Oligoalkylaminyphenoxy-Derivate; (Oligoalkylbenzyl)-phenyl- oder 4-Oligoalkylbenzyl)-phenoxy-Derivate sowie 4-Oligoalkoxybenzyl)-phenyl- oder 4-Oligoalkoxybenzyl)-phenoxy-Derivate; Trityl-Derivate; Benzyl-oxyaryl- oder Benzyloxyalkyl-Derivate; Xanthen-3-yl-oxyalkyl-Derivate; (4-Alkylphenyl)- oder ω -(4-Alkylphenoxy)-alkansäure-Derivate; Oligoalkyl-Phenoxyalkyl- oder Oligoalkoxy-phenoxyalkyl-Derivate; Carbamat-Derivate; Amine; Trialkylsilyl- oder Dialkyl-alkoxysilyl-Derivate; Alkyl- oder Aryl-Derivate und/oder Kombinationen davon; weitere mögliche Strukturen werden in der EP 1 214 350 beschrieben,

die in den Offenbarungsgehalt der Erfindung mit aufgenommen sind.

Bevorzugt können synthetische Peptide oder Fragmente hiervon durch chemische Crosslinker multimerisiert werden oder an ein Trägermolekül wie BSA, Dextran, KLH oder andere gekoppelt werden. Die hierzu verwendeten chemischen Crosslinker sind in "Bioconjugate Techniques", Greg T. Hermanson, Academic Press, 1996 aufgelistet, die in den Offenbarungsgehalt der erfindungsgemäßen Lehre mit aufgenommen sind. Bevorzugte Crosslinker sind homobifunktionale Crosslinker, bevorzugt: NHS-Ester, wie DSP, DTSSP, DSS, BS, DST, Sulfo-DST, BSOCOES, Sulfo-BSOCOES, EGS, Sulfo-EGS, DSG oder DSC, homobifunktionale Imidoester, wie DMA, DMP, DMS oder DTBP, homobifunktionale Sulfhydryl-reaktive Crosslinker, wie DPDPB, BMH oder BMOE, Difuorobenzenderivate, wie DFDNB oder DFDNPS, homobifunktionale photoreaktive Crosslinker, wie BASED, homobifunktionale Aldehyde, wie Formaldehyd oder Glutaraldehyd, Bis-Epoxide, wie 1,4-Butandiol diglycidylether, homobifunktionale Hydrazide, wie Adipinsäuredihydrazide oder Carbohydrazide, Bis-diazonium-derivate, wie o-Tolidin, bisdiazotisiertes Benzidin oder Bisalkylhaloid.

Bevorzugt sind auch heterobifunktionale Crosslinker, insbesondere aminreaktive und sulfhydrylreaktive Crosslinker, wie SPDP, LC-SPDP, Sulfo-LC-SPDP, SMPT, Sulfo-LC-SMPT, SMCC, Sulfo-SMCC, MBS, Sulfo-MBS, SIAB, Sulfo-SIAB, SMPB, Sulfo-SMBP, GMBS, Sulfo-GMBS, SIAX, SIAXX, SIAC, SIACX oder NP1A, carbonylreaktive und sulfhydrylreaktive Crosslinker, wie MPBH, M_2C_2H oder PDPH, aminreaktive und photoreaktive Crosslinker, wie NHS-ASA, Sulfo-NHS-ASA, Sulfo-NHS-LC-ASA, SASD, HSAB, Sulfo-HSAB, SANPAH, Sulfo-SANPAH, ANB-NOS, SAND, SADP, Sulfo-SADP, Sulfo-SAPB, SAED, Sulfo-SAMCA, p-Nitrophenyldiazopyruvat oder PNP-DTP, Sulfhydryl und

photoreaktive Crosslinker, wie ASIB, APDP, Benzophenon-4-iodoacetamid oder Benzophenon-4-maleimid, carbonylreaktive und photoreaktive Crosslinker, wie ABH, carboxylatreaktive und photoreaktive Crosslinker, wie ASBA, argininreaktive Crosslinker, wie APG, trifunktionale Crosslinker, wie 4-Azido-2-nitrophenylbiozotin-4-nitrophenylester, Sulfo-SEBD, TSAT und/oder TMEA.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die erfindungsgemäßen Peptide und rekombinant hergestellte Strukturen, durch Peptidbrücken mit einer Länge von 0 bis 50 Aminosäuren verbunden. Dies beinhaltet auch rekombinante Proteine, die aus zwei N-terminalen und einer C-terminalen Sequenz bestehen oder Hexamere bestehend aus drei N-terminalen Sequenzen und drei C-terminalen Sequenzen, oder Multimere der zuvor aufgeführten rekombinanten Strukturen, wobei zwischen den N- und den C-terminalen Sequenzen je eine Peptidbrücke von 0 bis 50 Aminosäuren vorhanden sein kann. Die Peptide können zum Zwecke der Aufreinigung, Solubilisierung bzw. der Konformationsveränderung mit spezifischen Fusionsanteilen entweder am N- oder am C-Terminus versehen sein, wie zum Beispiel CBP (Calmodulin-Bindungsprotein), His-Tag und/oder andere. Ähnliche Konstrukte können auch von DNA, die zum therapieren verwendet wird, kodiert werden.

Die Erfindung betrifft auch einen Kit, der ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül, einen erfindungsgemäßen Vektor, eine erfindungsgemäße Wirtszelle, ein erfindungsgemäßes Polypeptid, ein erfindungsgemäßes Erkennungsmolekül und/oder eine pharmazeutische Zusammensetzung gegebenenfalls zusammen mit einer Information - zum Beispiel einem Beipackzettel oder eine Internetadresse, die auf Homepages mit weiteren Informationen verweist, etc. - über die Handhabung bzw.

über die Kombination der Inhalte des Kits umfasst. Die Information zur Handhabung der Inhalte des Kits kann beispielsweise ein Therapieschema für Ödeme, Herzinsuffizienz, Leberzirrhose, Hyperinsulinismus, Hypertonie, Ulcus duodeni umfassen. Die Information kann jedoch auch Angaben darüber umfassen, wie die erfindungsgemäßen Stoffe und Erzeugnisse innerhalb einer Diagnose von Krankheiten, die mit der AKAP-PKA-Interaktion oder deren Entkoppelung assoziiert sind, einzusetzen sind. Der erfindungsgemäße Kit kann auch in der Grundlagenforschung verwendet werden. Innerhalb der Grundlagenforschung ist der Kit bevorzugt einsetzbar, um zu detektieren, ob ein Stoffwechselphänomen mit der Wechselwirkung bzw. mit der nicht vorhandenen Wechselwirkung von AKAP und PKA assoziiert ist. Insbesondere ist es möglich, mit Hilfe des erfindungsgemäßen Kits zu bestimmen, welche Untereinheiten von AKAP und/oder PKA für die Interaktion dieser beiden Moleküle oder für das Nichtzustandekommen der Interaktion zwischen diesen verantwortlich sind.

Die erfindungsgemäßen Erzeugnisse, wie beispielsweise Peptide, Vektoren, Nukleinsäuremoleküle, können andere vorteilhafte Nukleinsäuren, Aminosäuren, Kohlenhydrate bzw. Lipide umfassen. Es kann beispielsweise bevorzugt sein, dass die Peptide mit einem Fettrest, wie zum Beispiel einem Stearat, so modifiziert werden, dass diese gut membranpermeabel sind. Mit derartigen Peptiden können an Zellkulturen Versuche durchgeführt werden. Solche Peptide können als Werkzeuge eingesetzt werden, um die PKA besonders effizient von AKAP-Proteinen in Zellen, Zellkulturen, Gewebekulturen, Organkulturen oder Organismen zu entkoppeln. Die Peptide im Sinne der Erfindung werden in Zellkulturen insbesondere zur Beantwortung der Frage herangezogen werden können, ob ein bestimmter Prozess von

der Verankerung der PKA an AKAP-Proteine abhängt. Aufgrund der vorteilhaften hohen Affinität für die humanen RII α -Untereinheiten der PKA eignen sich die erfindungsgemäßen Peptide insbesondere für Untersuchungen an humanen Systemen. Durch den Vergleich mit Peptiden, die die PKA mit anderer Affinität binden, werden weiterhin quantitative Aussagen möglich sein, die definieren, bis zu welchem Grad eine PKA-AKAP-Interaktion notwendig ist, um den Ablauf eines physiologischen Prozesses zu gewährleisten. Insbesondere die erfindungsgemäßen Kits können verwendet werden, um diesen Ablauf des physiologischen Prozesses zu studieren. Von Vorteil ist es hierbei, dass die erfindungsgemäßen Peptide, die die RII-Untereinheiten der PKA stärker binden als die typischen PKA-Bindungsdomänen von AKAP18 δ . Da die erfindungsgemäßen Peptide vorteilhafterweise RII α - bzw. RII β -spezifisch sind, können zum Beispiel mit dem Kit besonders detaillierte Erkenntnisse über die Interaktion gewonnen werden. Die Entkoppelung der einen oder der anderen regulatorischen Untereinheiten der PKA von AKAP-Proteinen kann insbesondere Aufschluss darüber geben, welche PKA, TypII α oder TypII β , an dem jeweiligen zu untersuchenden Prozess beteiligt ist. Insbesondere das Peptid A18 δ RII β Rn1 bindet selektiv RII β Untereinheiten der PKA.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Modifikation, insbesondere eine Inhibition, bevorzugt eine Entkoppelung, einer AKAP-PKA-Interaktion bzw. der Interaktion von AKAP bzw. PKA-Untereinheiten umfassend die Schritte:

- a) Bereitstellung eines erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls, eines erfindungsgemäßen Vektors, einer erfindungsgemäßen Wirtszelle und/oder eines erfindungsgemäßen Polypeptids und

- b) In-Kontakt-Bringen mindestens eines Erzeugnisses gemäß a) mit einer Zelle, einer Zellkultur, einem Gewebe und/oder einem Zielorganismus.

Bevorzugt ist es, dass die Interaktion an einer regulatorischen R-Untereinheit analysiert bzw. modifiziert wird, besonders bevorzugt an einer RII α - und/oder RII β -Untereinheit.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Nukleinmoleküls, einer erfindungsgemäßen Wirtszelle, eines erfindungsgemäßen Organismus, eines erfindungsgemäßen Polypeptids, eines erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküls, einer erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung und/oder eines erfindungsgemäßen Kits zur Modifikation, insbesondere einer Inhibition, einer AKAP-PKA-Interaktion. Die Erfindung betrifft auch die Verwendung von Bruchstücken oder Teilbereichen der erfindungsgemäßen Peptide oder Nukleinsäuren. Weiterhin kann es vorgesehen sein, die erfindungsgemäßen Peptide oder Nukleinsäuren um weitere Aminosäuren oder Nukleotide zu erweitern. Selbstverständlich ist es auch möglich, die Peptide mit Lipid- oder Kohlenhydrat-Strukturen zu modifizieren.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung, insbesondere der erfindungsgemäßen Verwendung, wird die Zelle - beispielsweise als Zellkultur - oder der Organismus als Modell für die gewebs- und/oder zellspezifische AKAP-PKA-Interaktion verwendet, insbesondere als Modell für Diabetes insipidus. Weitere bevorzugte Modelle sind Zellkulturen, oder Gewebe, die erfindungsgemäße Nukleinsäuremoleküle oder Peptide umfassen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird durch die AKAP-PKA-Modifikation die Vasopressin-induzierte Umverteilung von AQP2 modifiziert, insbesondere verhindert.

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform werden das Polypeptid und/oder die pharmazeutische Zusammensetzung als Wasserverlust-verursachende Mittel verwendet, insbesondere als Aquaretika.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung, insbesondere der erfindungsgemäßen Verwendung, wird die Interaktion der RII α - oder RII β -Untereinheit des PKA mit AKAP modifiziert, insbesondere inhibiert.

In einer weiteren bevorzugten Verwendung sind die Untereinheiten humanem oder murinem Ursprungs.

Im Folgenden soll die Erfindung anhand von Beispielen näher erläutert werden, ohne auf dieses beschränkt zu sein.

Peptide zur Inhibition der Interaktion von Proteinkinase A und Proteinkinase A-Ankerproteinen

Material und Methoden

Herstellung von Peptidbibliotheken, die von der Sequenz der PKA-Bindungsdomäne von AKAP18 δ abgeleitet sind, auf Membranen

Alle Chemikalien und Lösungsmittel wurden bei Fluka (Steinheim) oder Sigma Aldrich (München) gekauft und ohne weitere Reinigungsschritte benutzt. Fmoc-geschützte Aminosäurepentafluorophenylester wurden bei Novabiochem Merck Biosciences GmbH (Darmstadt) gekauft.

Peptidbibliotheken wurden durch automatische SPOT-Synthese auf Whatman 50 Zellulosemembranen gemäß Standardprotokollen mittels Fmoc-Chemie und AutoSpot-Robot ASS 222 (Intavis Bioanalytical Instruments AG, Köln) synthetisiert. Schutzgruppen der Aminosäureseitenketten wurden durch eine Mischung aus Trifluoressigsäure (TFA) in Dichlormethan (DCM) abgespalten (Frank, 1992; Kramer und Schneider-Mergener, 1998). Zur Kontrolle wurden Spots (ca. 50 nmol Peptid pro Spot) aus der Zellulosemembran herausgeschnitten, von der Membran durch Behandlung mit 0,05m NaOH abgespalten und mit HPLC und MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert.

Detektion membranassoziierter Peptide im RII-overlay-Experiment mit regulatorischen RII α - und RII β -Untereinheiten der PKA als Sonde

Material

1. Regulatorische RII α - (human) und RII β - (Ratte) Untereinheiten der PKA erhalten von Prof. Dr. Friedrich W. Herberg, Universität Kassel
2. Katalytische Untereinheiten der PKA, Promega, Mannheim, Bestellnr.: V5161
3. [γ^{32} P]ATP 5000 Ci/mmol Amersham Biosciences, Braunschweig, Bestellnr.: AA0018
4. Sephadex G 50, medium Pharmacia, Bestellnr.: 17-0043-01
5. Phosphat-gepufferte Saline (PBS)
NaCl 8 g

KCl 0,2 g

Na₂HPO₄ 1,44 g

KH₂PO₄ 0,24 g

in 800 ml H₂O lösen, auf pH 7,4 einstellen und mit H₂O auf 1 l auffüllen.

6. Tris-gepufferter Saline mit Tween 20

Tris·HCl 10 mM

NaCl 150 mM

Tween 20 0,05%

pH 7,5

Radioaktive Markierung der regulatorischen Untereinheit von PKA

1. Reaktionsansatz

	Endkonzentration	Stammlsg.	im Ansatz
RII α oder RII β	15 μ g	2,7 μ g/ μ l	5,6 μ l
Katalytische Untereinheit der PKA	2 μ g	0,9 μ g/ μ l	2 μ l
Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0	25 mM	1 M	12,5 μ l
cAMP	10 μ M	1 mM	5 μ l
MgCl ₂	10 mM	0,5 M	10 μ l
DTT	0,5 mM	50 mM	5 μ l
[γ ³² P]ATP/ATP	0,1 μ M		
radioaktiv: 3,3 x 10 ⁸ cpm/ml = 75 μ Ci		5 μ Ci/ μ l	15 μ l
nicht radioaktiv:		10 μ M	5 μ l
H ₂ O		434,9 μ l	
10 min Inkubation bei 0 °C (auf Eis).			

2. Einstellung der ATP-Konzentration

Die ATP-Konzentration wurde durch Zugabe von nicht radioaktivem ATP auf 10 μ M eingestellt (Zugabe von 5 μ l einer 1 mM Lösung). Der Ansatz wurde weitere 50 min auf Eis inkubiert.

3. Stoppen der Reaktion und Überprüfung der Reaktion

Die Reaktion wurde durch Zugabe von Dextranblau und Abtrennung freier Nukleotide gestoppt. Das freie ATP wurde über eine Sephadex G50-Säule abgetrennt.

Abtrennung der markierten RII-Untereinheit der PKA von freien Nukleotiden über Sephadex G50-Säulen

Nicht eingebaute Nukleotide wurden von den RII-Untereinheiten durch die Fraktionierung über Sephadex G 50-Säulen getrennt.

1. Quellen des Sephadex G 50-Materials: 20 g wurden in 400 ml PBS über Nacht bei Raumtemperatur gequollen. Nicht abgesetztes Material wurde anschließend mit einer Pasteurpipette entfernt. Das gequollene Material wurde in 50 ml Falcon Röhrchen aliquottiert und bei 4 °C gelagert. Zur Konservierung wurde Natriumazid in einer Endkonzentration von 0,01 % zugesetzt.
2. Das Material wurde in eine mit einer Glaskugel verschlossene 10 ml sterile Einmalpipette gegossen. Zum Setzen des Säulenbettes liefen etwa 50 ml PBS, das 1 mg/ml BSA (bovines Serumalbumin) enthielt, durch.

Bis zur Benutzung der Säule wurde sie oben mit Parafilm verschlossen.

3. Die markierten RII-Untereinheiten (500 μ l) wurden mit Dextranblau (70 μ l einer 20 mg/ml Lösung) auf die Säule aufgetragen (Gesamtvolumen = 570 μ l).
4. Nachdem die Probe in die Matrix eingewandert war, wurde mit PBS aufgefüllt.
5. Kurz bevor das Dextranblau eluierte, wurde begonnen Fraktionen zu sammeln (2 Fraktionen je 1,5 ml, die weiteren Fraktionen je 1 ml).
6. Zur Bestimmung der Inkorporation von ^{32}P wurde 1 % (5,7 μ l) der Probe vor der Säule (das entspricht 1 % der eingesetzten Radioaktivität) und 3 μ l jeder Fraktion eingesetzt.
7. Die Fraktionen des ersten Peaks, welcher die Sonde enthielt, wurden vereinigt. Die Einbaurate wurde in % errechnet und die spezifische Aktivität (cpm/ μ g Protein) bestimmt.

RII-overlay

1. Proteine (40 μ g) wurden mittels SDS-PAGE getrennt und durch das *semi dry*-Elektroblotverfahren auf eine PVDF-Membran (PVDF, Polyvinylidenfluorid) übertragen. Die membranassoziierten Proteine wurde mit Ponceau S gefärbt, um die Markerproteine auf der Membran zu identifizieren. Entfärbt wurde mit TBS.

2. Die Membran wurde in Blotto/BSA für 16 h bei 4 °C inkubiert:
10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.4
0,15 M NaCl 8,766 g/l
5 % (w/v) Magermilchpulver 50 g/l
0,1 % (w/v) BSA 1 g/l
(0,01 % antifoam (Sigma))
0,02 % NaN₃ 0,2 g/l
3. Das Blotto/BSA wurde durch frisches ersetzt und ³²P markierte RII-Untereinheiten dazugegeben (10⁵ cpm/ml). Es wurde für 4-6 h bei Raumtemperatur inkubiert.
4. Die Membran wurde 4 x 15 min in Blotto/BSA und 2 x 10 min in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.4, 0,15 M NaCl gewaschen.
5. RII-bindende Proteine wurden durch Exposition auf eine Phosphoimagerplatte detektiert.

Ergebnisse

Es wurde eine Peptidbibliothek, abgeleitet von der wildtypischen Aminosäuresequenz der PKA-Bindungsdomäne von AKAP18δ (PEDAELVRLSKRLVENAVLKAVQQY; Henn et al., 2004) auf einer Membran synthetisiert. Dazu wurde jede Aminosäure der wildtypischen Sequenz mit den 20 möglichen Aminosäuren substituiert. Figur 1 zeigt die Detektion der Peptide mittels der RII-overlay-Methode. Als Sonde wurden in diesem Fall radioaktive PKA RIIα- und RIIβ-Untereinheiten gleichzeitig eingesetzt. In allen späteren Experimenten wurden entweder RIIα- oder RIIβ-Untereinheiten als Sonde eingesetzt. Das Ergebnis zeigt deutliche Unterschiede in

der Bindungsfähigkeit der einzelnen Peptide an die R-Untereinheiten (unterschiedliche Signalintensitäten).

Figur 2 zeigt eine Wiederholung des Experiments mit ausgewählten Peptiden (AKAP18 δ -L304T, AKAP18 δ -L308D, AKAP18 δ -L314E) deren Bindungsfähigkeit an RII α - bzw. RII β -Untereinheiten aber separat in unterschiedlichen RII-overlay-Experimenten getestet wurde. Als Kontrollen wurden die Peptide Ht31, Ht31-P, AKAP18 δ -RI und AKAP18 δ -wt (wildtypische Sequenz) auf den gleichen Membranen synthetisiert und dem RII-overlay-Experiment unterzogen. Für die Quantifizierung wurden die Signale densitometrisch ausgewertet und auf das Signal, das für AKAP18 δ -wt erhalten wurde, bezogen. Die Quantifizierung spricht für eine stärkere Bindung von AKAP18 δ -L304T und AKAP18 δ -L314E sowohl an RII α - als auch an RII β -Untereinheiten, AKAP18 δ -RI und AKAP18 δ -L308D dagegen schwächer. Das bekannte Peptid Ht31 bindet beide regulatorische Untereinheiten etwa 5fach schwächer als das AKAP18 δ -wt und etwa 5-6fach schwächer als AKAP18 δ -L304T und AKAP18 δ -L314E. Die Bindung von Ht31 an die hier verwendeten regulatorischen RII α - und RII β -Untereinheiten ist nur unwesentlich stärker als die Bindung der Untereinheiten an Ht31-P, das die AKAP-PKA-Interaktion nicht hemmt (Klussmann et al., 1999; Alto et al., 2003). Damit sind die Peptide AKAP18 δ -wt, AKAP18 δ -L304T und und AKAP18 δ -L314E wesentlich effizientere Inhibitoren einer AKAP-PKA-Interaktion als Ht31.

Alto et al. (2003) entwickelten ein Peptid, AKAP_{IS}, das die Interaktion zwischen der murinen RII α -Untereinheit der PKA mit 5fach höherer Affinität bindet (K_D = 0,45 nM) als das Peptid Ht31 (K_D = 2,2 nM).

In unseren RII-overlay-Experimenten binden die Peptide AKAP₁₈ und Ht31 sowohl die humane RII α - als auch die RII β -Untereinheit der PKA aus der Ratte kaum, die von uns identifizierten Peptide AKAP18 δ -wt und AKAP18 δ -L304T und AKAP18 δ -L314E dagegen stark. Dieses Ergebnis spricht für Speziesunterschiede zwischen den murinen und humanen RII α -Untereinheiten, die zu unterschiedlichen Bindungsaffinitäten für die gleichen Peptide führen.

Identifizierung von Peptiden, die spezifisch RII β -Untereinheiten der PKA binden

Um Peptide zu finden, die entweder RII α - oder RII β -Untereinheiten der PKA binden und damit spezifisch die Interaktion von AKAP-Proteinen mit der Typ II α bzw. der Typ II β PKA hemmen, wurden anhand von dreidimensionalen Strukturmodellen der PKA-Untereinheiten aus der wildtypischen PKA-Bindungsdomäne von AKAP18 δ Peptide abgeleitet, die die AKAP-Bindungstasche blockieren könnten. Die Peptide (1-19) wurden parallel auf zwei Membranen synthetisiert und anschließend in RII-overlay-Experimenten auf ihre Bindungsfähigkeit an RII α - oder RII β -Untereinheiten der PKA getestet (Figur 3A). Die quantitative Auswertung zeigte u. a. einen deutlichen Unterschied der Bindung der beiden PKA-Untereinheiten an das Peptid 7, dessen Sequenz neben derer der anderen Peptide in der Figur 3B aufgelistet ist.

Ausgehend von der Sequenz des Peptids 7 wurden zwei Peptidbibliotheken auf Membranen synthetisiert und RII-overlay-Experimenten mit RII α - bzw. RII β -Untereinheiten als Sonden unterzogen. Figur 4 zeigt, dass einige Peptide RII α -binden, aber nicht RII β -Untereinheiten (zum Beispiel die

Peptide 10/11 und 10/12) und umgekehrt (zum Beispiel Peptid 21/4). Darüber hinaus weisen einige Peptide eine stärkere Bindung an RII α -Untereinheiten als an RII β -Untereinheiten auf. Bei anderen ist es umgekehrt. Sie binden RII α -Untereinheiten schwächer als an RII β -Untereinheiten. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass wir mit den genannten Peptiden A18 δ RII α Hs1 und 2 und A18 δ RII β Rn1 die ersten Blocker gefunden haben, die selektiv die Interaktion von RII α - bzw. RII β -Untereinheiten der PKA mit AKAP-Proteinen identifiziert haben.

Tab. 1 A

Nr. A	ANDAQLVRLSKRLVENAVLKAVQQY	
Nr. B	ANDAQLVRLSKRLVENAVLKAVQQY	
Nr. C	ASDAQLVRLSKRLVENAVLKAVQQY	
Nr. D	ASDAKLVRLSKRLVENAVLKAVQQY	
Nr. E	ARDAKLVRLSKRLVENAVLKAVQQY	
Nr. F	ARDAQLVRLSKRLVENAVLKAVQQY	
Nr. G	ANDARLVRLSKRLVENAVLKAVQQY	
Nr. H	ASDARLVRLSKRLVENAVLKAVQQY	
Nr. I	ASDAKTVRLSKRLVENAVLKAVQQY	
Nr. J	ANDAKTERLSKRLVENAVLKAVQQY	
Nr. K	ANDAKTERLSQRLVENAVLKAVQQY	
Nr. L	ANDAKTQRLSQRLVENAVLKAVQQY	
Nr. M	PEDAELVRLSKRLVENAVLKAVQQY	
Nr. N	PEDAELVRLSKRLVENAVLQAVQQY	
Nr. O	PEDAELVRLSKRLVENAVLNGVQQY	
Nr. P	PEDAELVRLSKRLVENAVLNGQQQY	
Nr. Q	PEDAELVRLSKRLVENAVLNGNQY	
Nr. R	PEDAELVRLSKRLVENAVKNGNQY	
Nr. S	PEDAELVRLSKRLVENAVKNGAQDY	
Nr. T	PEDAELVRLSKRLVENAVLKAVQQY	(Akap18 δ -wt)
Nr. U	PEDAELVRTSKRLVENAVLKAVQQY	(AKAP18 δ -L304T)
Nr. V	PEDAELVRLSKRDVENAVLKAVQQY	(AKAP18 δ -L308D)
Nr. W	PEDAELVRLSKRLVENAVEKAVQQY	(AKAP18 δ -L314E)
Nr. X	PEDAELVRLSKRLPENAVLKAVQQY	(AKAP18 δ -P)
Nr. Y	PEDAELVRLSKRLPENAPLKAVQQY	(AKAP18 δ -PP)
Nr. Z	PEDAELVRLDKRLPENAPLKAVQQY	(AKAP18 δ -phos)
Nr. AA	EPEDAELVRLSKRLVENAVLKAVQQYLEETQ	(Akap18 δ -RI)
Nr. BB	ANDARLVRLSKRLRENAVLIKAVQQY	(A18 δ RII α Hs1 (14/14))
Nr. CC	ANDARLVRLSKRLYENAVLIKAVQQY	(A18 δ RII α Hs2 (14/19))

Nr. DD	ANDARLVRLSKRLVENAVLK FVQQY	(A18δRIIβRn1 (21/4))
Nr. EE	ANDARLVRLNKRLVENAVLKAVQQY	(A18δRIIαRn2 (10/11))
Nr. FF	ANDARLVRLPKRLVENAVLKAVQQY	(A18δRIIαRn3 (10/12))
Nr. GG	ANDARLVRLSKRDVENAVLKAVQQY	(A18δRIIαRn4 (13/02))
Nr. HH	YQEQL EEEVAKVIVSMSIAFAQQTE	(AKAP450_1)
Nr. II	NLQKIVEEKVAAALVSQIQLEAVQE	(AKAP450_2)

Tab. 1

SEQ ID Nr. 1	PEDAELVRLSKRLVENAVLKAVQQY	(AKAP18δ-wt)
SEQ ID Nr. 2	PEDAELVRTSKRLVENAVLKAVQQY	(AKAP18δ-L304T)
SEQ ID Nr. 3	PEDAELVRLSKRDVENAVLKAVQQY	(AKAP18δ-L308D)
SEQ ID Nr. 4	PEDAELVRLSKRLVENAVEKAVQQY	(AKAP18δ-L314E)
SEQ ID Nr. 5	PEDAELVRLSKRLPENAVLKAVQQY	(AKAP18δ-P)
SEQ ID Nr. 6	PEDAELVRLSKRLPENAPLKAVQQY	(AKAP18δ-PP)
SEQ ID Nr. 7	PEDAELVRDLKRLPENAPLKAVQQY	(AKAP18δ-phos)
SEQ ID Nr. 8	EPEDAELVRLSKRLVENAVLKAVQQYLEETQ	(AKAP18δ-RI)
SEQ ID Nr. 9	NTDEAQQEELAWKIAKMIVSDIMQQA	
SEQ ID Nr. 10	VNLDDKAVLAEKIVAEAEIKAEEREL	
SEQ ID Nr. 11	NGILELETKSSKLVQNI IQTAVDQF	
SEQ ID Nr. 12	TQDKNYEDEL TQVALALVEDVINYA	
SEQ ID Nr. 13	LVDDPLEYQAGLLVQNAIQQAI AEQ	
SEQ ID Nr. 14	QYETLLIETASSLVKNAIQLSIEQL	
SEQ ID Nr. 15	LEKQYQEQL EEEVAKVIVSMSIAFA	
SEQ ID Nr. 16	EEGLDRNEEIKRAAFQIISQVISEA	
SEQ ID Nr. 17	ETSAKDNINIEEAARFLVEKILVNH	
SEQ ID Nr. 18	ADRGSPALSSEALVRVLVLDANDNS	
SEQ ID Nr. 19	SDRGSPALSSEALVRVLVLDANDNS	
SEQ ID Nr. 20	TDRGFPALSSEALVRVLVLDANDNS	
SEQ ID Nr. 21	FLAGETESLADIVLWGALYPLLQDP	
SEQ ID Nr. 22	SELLKQVSAAASVVSQALHDL LQHV	
SEQ ID Nr. 23	EKESL TEEEATEFLKQILNGVYYLH	
SEQ ID Nr. 24	EKGYYSERDAADAVKQILEAVAYLH	
SEQ ID Nr. 25	WLYLQDQNKAAADAVGEILLSLSYLP	
SEQ ID Nr. 26	LKISPVAPDADAVAAQILSLLPLKF	

SEQ ID Nr. 27 SKTEQPAALALDLVNKLVYWVDLYL
SEQ ID Nr. 28 VLASAYTGRLSMAAADIVNFLT VGS
SEQ ID Nr. 29 VKLSNLSNLSHDLVQE AIDHAQDLQ
SEQ ID Nr. 30 APSDPDAVS AEEALKYLLHLVDVNE
SEQ ID Nr. 31 QMKAKRTKEAVEVLKKALDAISHSD
SEQ ID Nr. 32 KDKLKPGAAEDDLVLEV VIMIGTVS
SEQ ID Nr. 33 EKR VADPTLEKYVLSV VLD TINAFF
SEQ ID Nr. 34 QENLSLIGVANVFLES LFYDVKLQY
SEQ ID Nr. 35 HQSVVYRKQAAMILNELVTGAAGLE
SEQ ID Nr. 36 QQLQKQLKEAEQILATAVYQAKEKL
SEQ ID Nr. 37 HSVMDTLAVALRVAEEAIEEAISKA
SEQ ID Nr. 38 RQVQETLNLEPDVAQHLLAHSHWGA
SEQ ID Nr. 39 DIP SADRHKSKLIAGKIIPAIATTT.

Tab. 2

Peptid	RII α -Bindung K _D [nM]	RII β -Bindung K _D [nM]
AKAP18 δ wt	0,4 - 1,5	1 - 6
AKAP18 δ L304T	0,3 - 0,9	35
AKAP18 δ L314E	0,2 - 1,3	22
AKAP18 δ L308D	keine Bindung	keine Bindung
AKAP18 δ -P	keine Bindung	keine Bindung
AKAP18 δ -PP	keine Bindung	keine Bindung
Ht31	15	35
Ht31-P	keine Bindung	keine Bindung
AKAP _{IS}	keine Bindung	keine Bindung
AKAP _{IS} -P	keine Bindung	keine Bindung

Tabelle 2. Bindungskonstanten für die Interaktion von humanen RII α - und RII β -Untereinheiten aus der Ratte mit den angegebenen Peptiden, die aus der wildtypischen RII-Bindungsdomäne von AKAP18 δ (AKAP18 δ wt) abgeleitet wurden. Die Werte wurden durch *surface plasmon resonance*-Messungen erhalten. L, Leuzin, T, Threonin, D, Aspartat, P, Prolin, IS, in silico. 304, 308 und 314 bezeichnen die Position der entsprechenden Aminosäuren in AKAP18 δ .

Weitere Peptide, die AKAP-PKA-Interaktionen hemmen

Neben den in den Abbildungen 1-4 beschriebenen Peptiden konnten weitere identifiziert werden, die als Hemmer von AKAP-PKA-Interaktionen wirken. Zum Nachweis dieser Eigenschaft wurden die unten aufgeführten Peptide auf einer Zellulosemembran synthetisiert (SPOT-Syntheseverfahren) und einem RII-overlay unterzogen (Abb. 5). Alle schwarzen Punkte repräsentieren Peptide, die regulatorische PKA-Untereinheiten gebunden haben. Die Peptide wurden in sechs Blöcken synthetisiert. Die Peptide der Reihe A Positionen 1-17 sind Positivkontrollen und in allen Blöcken identisch. Die Namen der unten aufgeführten Peptide sind aus ihren Koordinaten in den Blöcken 1-6 abgeleitet, beispielsweise ist das Peptid 1.B13 (Sequenz: YIALNEDLRSWTAADTAAQISQRKL) im Block 1 in der Reihe B an der Position 13 zu finden.

Die Abb. 5. zeigt die Identifizierung von Peptiden, die AKAP-PKA-Interaktionen hemmen. Kandidatenpeptide wurden auf einer Membran synthetisiert und mit radioaktiv markierten regulatorischen RII-Untereinheiten der PKA inkubiert (RII-overlay-Experiment). Alle schwarzen Punkte repräsentieren Peptide, die regulatorische PKA-Untereinheiten gebunden haben (detektiert mit einem Phosphorimager). Die Peptidsequenzen sind in der beigefügten Liste (Tab. 3) aufgeführt:

Tab. 3. Sequenz der Peptide

No	Sequence	Name/ID-Nr.
1	YIALNEDLRSWTAADTAAQISQRKL	1C17 HUMAN
2	ISKEHWNPTIVALVYNVLKTLMEMN	2A5A HUMAN
3	DAPEFHRSRYITTVIQRIFYTVNRSW	2ACA HUMAN
4	GSTFQNTYNLKDIAGEAISFASGKI	2ACA HUMAN

5	LSRYNDQASSRRIERIFSGAVTRG	2ACA HUMAN
6	EASEFHSRYITTQIRIFYAVNRSW	2ACC HUMAN
7	QSEYSWRKMLSGIAAFLLGLIFLLV	2DOB HUMAN
8	LLLLFWLGWLGMLAGAVVIIVRAPR	4F2 HUMAN
9	LYFHLAPKAEVGVIAKALVRLLRSH	A3B2 HUMAN
10	VKQNVKMSSESQAALPSALKTLQQKL	A4E1 HUMAN
11	DPGALGRLGAWALLFFLVTTLLASA	AAAT HUMAN
12	GQVEGGMNIGLVVFAIVFGVALRK	AAAT HUMAN
13	EPTTGMDPKARRFLWNLIIDLIKTG	ABC2 HUMAN
14	RLRGISWKDEARVVKWALEKLELTK	ABC2 HUMAN
15	LIQSLESNPLTKIAWRAAKPLLMGK	ABCR HUMAN
16	AYTTQSLASVAYLINTLANNVLQML	ABI2 HUMAN
17	TLSKTKNLRLLLVGRLFMWEEPEI	ABM2 HUMAN
18	RYGAAEPHTIAAFLGAAAQEVIKI	ABP1 HUMAN
19	NKDDDESPGLYGFLHVIVHSAKGFK	ABR HUMAN
20	PTTHAMSPRLRHVLELLPRLLGSP	ACHE HUMAN
21	PGSAQEKSIERRFLNGLFSKLQPRD	AD13 HUMAN
22	HFDPTTAFRAPDVARALLRQIQVSR	AGRN HUMAN
23	HYKETWKALEALVAKGLVQALGLSN	AKA1 HUMAN
24	QKLYLDRNLIAAVAPGAFLGLKALR	ALS HUMAN
25	KEIKSYLKRIFQLVRFLFPELPEEG	ALS2 HUMAN
26	AISPWKTYQLVYFLDKILQKSPLPP	AMPB HUMAN
27	GGAAGDEAREAAAVRALVARLLGPG	ANAG HUMAN
28	GARSGHEQVVEMLLDRAAPILSKTK	ANK3 HUMAN
29	SRTSSPVKSSLFLAPSALKLSTPSS	ANK3 HUMAN
30	TSYPWSWARVGPAVELALAQVKARP	ANPA HUMAN
31	TIDRETSGNLEQLLAVVKSIRSIP	ANX5 HUMAN
32	AVQNRPHGDAQVALLGLASVIKNTF	ANX9 HUMAN
33	PFRIYQTTTERPFIQKLFPRVAADG	APG5 HUMAN
34	RDRASYEARERHVAERLLMHLEEMQ	ARH1 HUMAN
35	EKLKSRPAHLGVFLRYIFSQADPSP	ARHB HUMAN
36	NNTEKTVKKIKAFVEQVANVVLVYSS	ARRS HUMAN
37	EINVERDEKLIKVLDKLLLYLRIVH	ARS2 HUMAN
38	ELLQSETDKVVRVAIALRNLSLDR	ARVC HUMAN
39	LVASSQSVREAKAASHVLQTVWSYK	ARVC HUMAN
40	EFKTLSEEEIEKVLKNIFNISLQRK	ARY1 HUMAN
41	EFKTLTEEEVEVLKNIFKISLGRN	ARY2 HUMAN
42	VINLIGQTPISRLVALLVRGLGTEK	ASB8 HUMAN
43	GSAAMAASSVSVVLSSLFLKLYRKP	AT7A HUMAN
44	PRSVRDTILSRALILKILMSAIIII	ATC4 HUMAN
45	EWGTGYTAFVVGILVQQIADLIIRKT	ATHL HUMAN
46	ADDQGOHPLLKMLLHLLAFSSAATG	ATIP HUMAN
47	GLGGAWAFVLRDVIYTLIHYINQRP	ATM HUMAN
48	STDEYYYYALAIIVMSIVSIVSSLY	ATY3 HUMAN
49	APQRKTTNPLDLAVMRLAALQONVE	BA2A HUMAN

50	MGALARALLPLLAQWLLRAAPELA	BAE2_HUMAN
51	TTLLRLPQKVFDVVEAVARASLIP	BAE2_HUMAN
52	DASYSLILEVQTAIDNVLIQSDVPI	BBS7_HUMAN
53	EKEEVPEGMEEAAVASVVLPARELQ	BC13_HUMAN
54	SHELRSKILSLQLLLSILQNAGPIF	BIG1_HUMAN
55	SHREAWTNLLLLFLTKVLKISDNRF	BIG1_HUMAN
56	HQSNKGYSLASLLAKVAAGKEKSSN	BIR6_HUMAN
57	LIQTSSTEQLRTIIRYLLDTLLSLL	BIR6_HUMAN
58	RGNLPTSGNISGFIRRLFLQLMLED	BIR6_HUMAN
59	VTFHLPHHVLKSIASATVNELKKIN	BIR6_HUMAN
60	GAVYKGSlderPVAVKVFSFANRQN	BMR2_HUMAN
61	LTKISLKNLDHLLASLLFEYISY	BP28_HUMAN
62	LVQLVDTLGAEKFLWILLILLFEQY	BP28_HUMAN
63	RLTSLKKTlATTLAPRVLLPAIKKT	BP28_HUMAN
64	PISGQTYSVEDAVLKGVDPEFRIR	BPA1_HUMAN
65	WAKQHQQRLASALAGLIAKQELLEA	BPEA_HUMAN
66	HKAELKPLRADYLIARVTVLEKLI	BPL1_HUMAN
67	ASTLILTPTSKDVLNLMISRGKE	BRC2_HUMAN
68	ENREKVNDQAKLIVGIVVGLLLAAL	C166_HUMAN
69	YRNGKVLHPLEGAVVIFKKEMDPV	C166_HUMAN
70	NITDLGAYKLAEALPSLAASLLRLS	C2TA_HUMAN
71	DFRKKARQSIQGILEAAFSEELTRS	C3AR_HUMAN
72	SIGLQNFEIAKDFVVKVIDRLSRDE	CA16_HUMAN
73	VKPSSTRGGVLFATDAFQKVIYLG	CA1E_HUMAN
74	RLGEQNFKARRFVEQVARRLTLAR	CA26_HUMAN
75	SIGYTNFTLEKNFVINVNRLGATA	CA26_HUMAN
76	IYDERGARQLGLALGPALGLLGDPF	CA35_HUMAN
77	GSFAWHMNRsIVLLKVLQALRDHS	CABI_HUMAN
78	YKTSTVSADLANLLKRIATIVPRTE	CABI_HUMAN
79	HSGFIETEELKNFLKDLLEKANKTV	CABV_HUMAN
80	TNTQVEGDDEAAFLERLARREERRQ	CALD_HUMAN
81	FQLQRPPQNLLRLLRKAVERSSLMG	CANB_HUMAN
82	LYLRQNSMGLFSALRHALAKESLVG	CANC_HUMAN
83	DKVTQKQFQLKEIVLELVAQVLEHK	CAQ2_HUMAN
84	EGFHLLGQPLSHLARRLLDTVWNKG	CARF_HUMAN
85	ELYLRKRHHEPGVADRILIRLLQETS	CARF_HUMAN
86	LIRSLYEMQEERLARKAARGLNVGH	CARF_HUMAN
87	RLLDLATVKANGLAAFLQHVQELP	CARF_HUMAN
88	EGFSFNPLKIEVFVQTLHLAAKSF	CB80_HUMAN
89	RITQDAQLKSSKVHKAQLQNEEG	CBG_HUMAN
90	VKKAPDAEELDKVARLAAKALASVS	CBP4_HUMAN
91	MEQVAHQITVMQFILELAKSLKVDP	CC37_HUMAN
92	FKITRYWNSLSNLVASLLNSVRSIA	CCAC_HUMAN
93	HIPTPGAALSWQAIDAARQAKLMG	CCAC_HUMAN
94	NWLTEVQDTANKALLALFTAEMLLK	CCAC_HUMAN

95	PNSSKQTVLSWQAAIDAARQAKAAQ	CCAD_HUMAN
96	RTLLWTFIKSFQALPYVALLIAMIF	CCAF_HUMAN
97	VRHKYNFDNLGQALMSLFLVASKDG	CCAG_HUMAN
98	LRVISRAPGLKLVVETLISSLKPIG	CCAI_HUMAN
99	NYMFTTVFVLEAVLKLVAFGLRFF	CCAI_HUMAN
100	VGNLGLLFMLLFFIYAALGVELFGK	CCAI_HUMAN
101	VHHKYNFDNLGQALMSLFLVASKDG	CCAI_HUMAN
102	FKITKYWTSLSNLVASLLNSIRSLA	CCAS_HUMAN
103	HNQPLWLTRLQDIANRVLLSLFTTE	CCAS_HUMAN
104	VKSKEEAQHVRVLAQLLRREAAIT	CD93_HUMAN
105	RVAQDLGLELAELVPRLFRVASKTH	CDA1_HUMAN
106	VFSRRGGLGARDLLWLLLLAAWEV	CDA1_HUMAN
107	RIAQDLGLELEELVPRLFRVASKRH	CDA2_HUMAN
108	RRGRGAWTRLLSLLLLAAWEVGSQ	CDA2_HUMAN
109	RIAQDLGLELAELVPRLFRVASKRH	CDAD_HUMAN
110	RIAQDLGLELAELVPRLFRVASKGR	CDA5_HUMAN
111	RIAQDLGLELAELVPRLFRMASKDR	CDA6_HUMAN
112	PTSNQQVKPLGLVLRKLLDREETPE	CDA9_HUMAN
113	RIAQDLGLELAELVQRLFRVASKRH	CDAA_HUMAN
114	ALLATQAGSAGGAVNKLVRPSVGAG	CDAB_HUMAN
115	RIAQDLGLELAELVQRLFRVASKTH	CDAB_HUMAN
116	VIIGPRGPGSQRLLLSLLLLAAWEV	CDAC_HUMAN
117	ADRGSPALSSEALVRVLVDANDNS	CDB2_HUMAN
118	HYSVAEETESGSFVANLLKDLGLEI	CDB2_HUMAN
119	TDRGSPALSSEALVRVLVDANDNS	CDBE_HUMAN
120	SDRGSPALSSEALVRVLVDANDNS	CDB9_HUMAN
121	TDHGSPALSSEALVRVLVDANDNS	CDBC_HUMAN
122	SDHGSPALSSEALVRVVVDANDNS	CDBD_HUMAN
123	TDRGFPAALSSEALVRVLVDANDNS	CDBF_HUMAN
124	PPQRHPQRSEQVLLLTLGLTWGAA	CDG6_HUMAN
125	TPRFLKEELEVKILENAAPSSRFPL	CDG6_HUMAN
126	RGPAGQRRMLFLFLLSLLDQVLSEP	CDGF_HUMAN
127	SGGGSDEGLASAAAARGLVEKVRQLL	CDN5_HUMAN
128	TRMAAESRRVLLLAGRLAAQSLDTS	CENB_HUMAN
129	MGSEDHLGVIPRAIHDFQIKKKFP	CENE_HUMAN
130	KRGPLLTAASAASALHKLHQDL	CEP2_HUMAN
131	EYHYVQEKASKLAAASLLALYMKK	CGB3_HUMAN
132	YIDENQDRYIKKLAKWVAIQSVSAW	CGL1_HUMAN
133	ANPVEIRRGVMLAVDAVIAELKKQS	CH60_HUMAN
134	PVAVRLQMSENRILSRLANRAPEPT	CHD4_HUMAN
135	ARERERLAHSRRRAAARAVAAATAAV	CIK4_HUMAN
136	LKTISVIPGLKTIVGALIQSVKKLS	CIN9_HUMAN
137	LSRFEGMRVVVNALLGAIPSIMNVL	CIN4_HUMAN
138	LYILTPFPNPLRKIAIKILVHSLFSM	CIN1_HUMAN
139	LYILTPFPNPIRKLAIKILVHSLFNM	CIN2_HUMAN

140	LSRFEGMRVVNALVGAIPSIMNVL	CIN5_HUMAN
141	LYILTPLNPPVRKIAIKILVHSLFSM	CIN3_HUMAN
142	LKTITVIPGLKTIVGALIQSVKKLS	CIN4_HUMAN
143	LKTISVISGLKTIVGALIQSVKKLA	CIN5_HUMAN
144	LYVLSPFHPVRRAAVKILVHSLFNM	CIN5_HUMAN
145	LYILSPFNLIIRRIAIKILIHVSFMS	CIN8_HUMAN
146	EEQLRLRERELTALKGALKEEVASR	CING_HUMAN
147	NYGKFEKGYLIFVVRFLFGLVNQER	CIS1_HUMAN
148	RGALLAGALAAAYAYLVLGALLVAR	CIW6_HUMAN
149	AQKVTRQEREEALVRGVFMKVVKPK	CJ11_HUMAN
150	MLRYDVYGGENEVIPEVLRKSHSHF	CJ24_HUMAN
151	ERQSAEVQGSALVSRALEAAERAL	CK13_HUMAN
152	RSGYIEANELKGFLSDLLKKANRPY	CLB2_HUMAN
153	VRRKLGEDWIFLVLLGLLMALVSWS	CLC1_HUMAN
154	AYIVNYFMYVLWALLFAFLAVSLVK	CLC5_HUMAN
155	LIHSVSDAFSGWLLMLLIGLLSGSL	CLC5_HUMAN
156	YFPLKTLWRSFFAALVAAFTLRSIN	CLC5_HUMAN
157	RKKGRESYIETELIFALAKTSRVSE	CLH2_HUMAN
158	FAGSWRSGLAFLAVIKAIDPSLVDM	CLMN_HUMAN
159	GYFGSDVKVAYQLATRLLAHESTQR	CLR2_HUMAN
160	SPERFLSPLLGLFIQAVAATLATPP	CLR2_HUMAN
161	LQEQLYVRRALAARSLLDVLFPDD	CLR3_HUMAN
162	WQERFLSPLLGRFLEGVA AVLATPA	CLR3_HUMAN
163	YFSQDVRVTARLLAHLALAFESHQQG	CLR3_HUMAN
164	LGSVIDISGLQRAVKEALSAVLPRV	CN2A_HUMAN
165	SFMEHIAMPIYKLLQDLFPKAAELY	CN2A_HUMAN
166	WVSFTSLGSLPSALRPLL SGLVGGA	CN3B_HUMAN
167	HVIYQVRVDKAVGLAEALGLARANN	CN93_HUMAN
168	TDMKDMRLEAEAVVNDVLFVNNMF	CNC9_HUMAN
169	PKIVGRTKDVKEAVRKLAYQVLAEK	CND3_HUMAN
170	YGPTNFAPIINHVARFAAQAAHQGT	CNE1_HUMAN
171	LAHLRARLKELAALEAAAKHEELVE	CNG4_HUMAN
172	EEGGTPEQGVHRLQRLAHL LQADR	CNRC_HUMAN
173	WKGGSASTWLTAFALRVLGQVNKYV	CO5_HUMAN
174	DVLPNFFYHSNQVVRMAALEVYVRR	COA1_HUMAN
175	RQVQAEVPGSPIFVMRLAKQSRHLE	COA1_HUMAN
176	SSQFHMATNSSMFLKQAFEGEYPKL	COG5_HUMAN
177	VRRLEKYSSIPVIQGIVNEVRQSM	COG8_HUMAN
178	TDPDLPPGYVQSLIRRVMNVNIVI	COH1_HUMAN
179	GDVKSKEALKKVIIMILNGEKLPG	COPB_HUMAN
180	TFTLSTIKTLEEAVGNIVKFLGMHP	COPG_HUMAN
181	LLFGAWAGVLGTALSLLIRAE LGQP	COX1_HUMAN
182	RFIFNRVVL ENEAVRAAAVSALAKF	CPG2_HUMAN
183	RREEATRQGELPLVKEVLLVALGSR	CPSA_HUMAN
184	NATLFTA AEIAPFVEILLTNLFKAL	CSE1_HUMAN

185	SVNWKHKDAAIYLVTSLSKAQTQK	CSE1 HUMAN
186	ORREGGGRNIGGIVGGIVNFISEAA	CSS2 HUMAN
187	IEKESQRKSIDPALSMLIKSIKTKT	CT06 HUMAN
188	LDVIYWFRQIIAVVLGVIWGVLPRLR	CT24 HUMAN
189	HRLLSTEWGLPSIVKSLIGAARTKT	CT45 HUMAN
190	NKSGNRSEKEVRAAALVLQTIWGYK	CTD1 HUMAN
191	RHLTQQDPLSEAIVEKLIQSIQKVF	CTDB HUMAN
192	RFVKLAVMGLTVALGAAALAVKSA	CTE0 HUMAN
193	SVKRCNMVRAARALLSAVTRLLILA	CTN1 HUMAN
194	SVKRCMTMRAARALLSAVTRLLILA	CTN2 HUMAN
195	ARENAGPAIVISFLIAALASVLAGL	CTR1 HUMAN
196	VSSSAPSVYSVQALSLLAEVLASLL	CU05 HUMAN
197	VYRSDEKEKAVPLISRLLYYVFPYL	CU05 HUMAN
198	RGPHGQLSPALPLASSVLMMLMSTL	CV03 HUMAN
199	TLRFLHASALLALASGLLAVLLAGL	CV03 HUMAN
200	FNPFRRLRLQDLADRVVDASEDEH	CYA3 HUMAN
201	LHYYSEREGLQDIVIGIIKTVAAQOI	CYG1 HUMAN
202	WKGAPTTSLISVAVTKIIAKVLEDN	D7A1 HUMAN
203	YVASAFTLAVNIIAKKIVLKEQTGS	DCOR HUMAN
204	LLRILTDALVPYLVGQVVAGAALQ	DCUP HUMAN
205	AEKTDDEEEKEDRAAQSLNKLIRSN	DD19 HUMAN
206	DEERRQLIQLRDILKSALQVEQKED	DDF2 HUMAN
207	LGHPAAFGRATHAVVRALPESLGQH	DDH1 HUMAN
208	ASFQRKWFVAFVAAEELVHSEIPAF	DEP5 HUMAN
209	KVAFGTGSTEVGKLIKEAAGKSNLKR	DHA1 HUMAN
210	KIAFTGSTEVGKLIQEAAGRSNLKR	DHA2 HUMAN
211	EAIKFINRQEKPLALYAFSNSRQVV	DHA8 HUMAN
212	PRALLAALWALEAAGTAALRIGAFN	DHP1 HUMAN
213	RLVSSPPSGVPGLALLALLALLALR	DIAC HUMAN
214	RVVLKGDVSLKDIIDPAFRASWIAQ	DIAC HUMAN
215	FQLPSRQPALSSFLGHLAAQVQAAL	DIS1 HUMAN
216	RSLTSEREGLEGLSKLLVLSSRN	DIS1 HUMAN
217	LIGPKVRITLMKFLPSVFMDAMRDN	DJCD HUMAN
218	QRPRAPRSALWLLAPPLLRWAPPLL	DLG4 HUMAN
219	RQRLLGRSWSVPVIRHLFAPLKEYF	DM3A HUMAN
220	KRKLEDLSSEWKAVNRLLQELRAKQ	DMD HUMAN
221	LPARVPRPGLSEALSLLFAVVLRSR	DMK HUMAN
222	QRELQEALGARAALGRLQAER	DMN HUMAN
223	SARLRMVETLSNLLRSVVALSPDDL	DNL1 HUMAN
224	ELAEHLNASLAFFLSDLLSLVDRGF	DOC6 HUMAN
225	GPFRQOHFLAGLLLTALALEPEA	DOC6 HUMAN
226	LRAHGTHPAISTLARSATFSVTYPS	DOC6 HUMAN
227	IYEPPTYMSVNVQAAQQLLEIVQNQR	DPH5 HUMAN
228	HIYLYHHAQAHKALFGIFIPSQRR	DPOE HUMAN
229	FNWRQAHMQARFVILRVLLEAGEGL	DPP3 HUMAN

230	GVILGKMAILAILLGIALLFVLLT	DSC3 HUMAN
231	PNTELNVSRLEAVLSTIFYQLNCRM	DTNA HUMAN
232	RLDEEHRLIARYAARLAAESSSSQP	DTNA HUMAN
233	LTSVLGILASSTVLFMLFRPLFRWQ	DUFF HUMAN
234	PQELYESSHIESAINVAIPGIMLRR	DUS6 HUMAN
235	SRELYESARIGGALSVALPALLRR	DUS9 HUMAN
236	DYYKKQVAQLKTLITMLIGQLSKGD	DYH9 HUMAN
237	RDFVEEKLGSKYVVGRALDFATSFE	DYH9 HUMAN
238	IGVKFLINEATTLADLLALRLHRVE	DYHB HUMAN
239	EGKKKQTNYLRTLINELVKGILPRS	DYHC HUMAN
240	GPSGSGKSMARVLLKALERLEGVE	DYHC HUMAN
241	KLVAEDIPLLFSLSDVFPVQYHR	DYHC HUMAN
242	LLSATELDKIRQALVAIFTHLRKIR	DYHC HUMAN
243	WRRFRWAILFIILFILLFLAIFI	DYSF HUMAN
244	PVRREVTDKQEFAARAQLEYQQ	E4L3 HUMAN
245	FPGDILMRMLKMLIPLIISLITG	EAA2 HUMAN
246	KLMVDFFNILNEIVMKLVIMIMWYS	EAA2 HUMAN
247	FPGEILMRMLKMLIPLIISMITG	EAA3 HUMAN
248	PFMSAVSGRAYPAAITILETAQKIA	EDD HUMAN
249	RNTFAERLSAVEAIAAISVVSSNG	EDD HUMAN
250	NAAQTPRIPSRLLAILLFLAMLIT	EFA5 HUMAN
251	GLKELPMRNLQEILHGAVRFSNNPA	EGFR HUMAN
252	MVETQQLMRVYGALMWALGKVVGTP	EHD2 HUMAN
253	HGIVSWDTFSVAFIKKIASFVNKSA	ELM1 HUMAN
254	HGIVSWDMVSITFIKQIAGYVSQPM	ELM2 HUMAN
255	VMNQQLQTKAMALLTALLQGASPVE	ELM3 HUMAN
256	ESRVQQQEDEITVLKAALADVLRRL	EML4 HUMAN
257	GQFGVGIFYSAFLVADKVIVTSKHNN	ENPL HUMAN
258	ELSSQLPERLSLVIGSILGALAFLL	EPB6 HUMAN
259	MYRTHTRRALQTVAQLILELIEKQE	EPPL HUMAN
260	SGRAAALRQVVSAVTALVEAAERQP	EPPL HUMAN
261	RLQALRLEREYVLLKALALANSDS	ERR1 HUMAN
262	GESAGGESVSVLVLSPLAKNLFHRA	EST1 HUMAN
263	TPQKNYNYSIAAILIGVLLTSMLVA	EV2B HUMAN
264	ALRPAPALLAPAVLLGAALGLGLGL	EVC HUMAN
265	NILVTTTQLIPALAKVLLYGLGIVF	EYA1 HUMAN
266	NVLVTTTQLIPALAKVLLYGLGSVF	EYA2 HUMAN
267	PADEKLQEKAWGAVVPLVGKLKKFY	F49B HUMAN
268	VEQRKKLSSLLEFAQYLLAHSMFSR	FACA HUMAN
269	NRLGIESPRSEKLARELLKELRTQV	FACC HUMAN
270	QORAQTMVQVKAVLGHLLAMSRSSS	FACC HUMAN
271	SGQSKLNSWIQGVLSHILSALRFDK	FACC HUMAN
272	ETRRGAYLNALKIAKLLLTAIGYGH	FAFX HUMAN
273	SQAYDNLSLSDHLLRAVLNLLRREV	FAFX HUMAN
274	WVVPVLPKGELEVLLEAAIDLSKKG	FAFX HUMAN

275	WVVPVLPKGELEVLLLEAAIDLSVKG	FAFY_HUMAN
276	RSNDKVYENVNTGLVKAVIEMSSKIQ	FAK1_HUMAN
277	ARTSSAEYNVNNLVSPVLFQEALWH	FAS_HUMAN
278	FRYMAQKGKHIGKVVVQVLAEEPVL	FAS_HUMAN
279	AVTIHPVTGSISVLNPAFLGLSRKL	FAT2_HUMAN
280	PGPAPLRLLLEWRVAAGAAVRIGSVL	FCP1_HUMAN
281	MEEWDYPRIGDILQKLAPFLKMYG	FGD1_HUMAN
282	SGTKKSDFHSQMAVHKLAKSIPLRR	FGR1_HUMAN
283	PSHSLRLRLPLLQLLLLVVQAVGRGL	FK10_HUMAN
284	DVFIWLGRKSPRLVRAAALKLGOEL	FLIH_HUMAN
285	HRLLQQLVLSGNLIKEAVRRLQRAV	FRT2_HUMAN
286	LPHGSGGLGTSSILAGTALAALQRAA	FUK_HUMAN
287	PESTARMQGAGKALHELLLSAQRQG	G45G_HUMAN
288	PKVDKWSRFLFPLAFGLFNIVYWVY	GAAT_HUMAN
289	RLFTNLKDTSSKVIQSVANYAKGDL	GAK_HUMAN
290	ESLREVQLEEELEAARDLVSKEGFRR	GAL1_HUMAN
291	RPFLPYFNVSQFATFVLKGSFSEI	GALC_HUMAN
292	NHGMWQTISVEELARNLVIKVNRDA	GAS6_HUMAN
293	AGEDPKVTRAKFFIRDLFRLRISTAT	GBAF_HUMAN
294	PSVFGSNPKAHIAAKTVFHLAHRHG	GBF1_HUMAN
295	HGRLFITVLFSSIIWVWISMLLR	GC5D_HUMAN
296	NVLKDKMEKLKRLQVAARKSQVTL	GCC1_HUMAN
297	TINKFDKNFSAHLLDLLARLSIYST	GCP2_HUMAN
298	IINNDTTITLAIIVVDKLAPRLSQLK	GCP5_HUMAN
299	GLLTEKAAPVMNVIHSIFSLVLKFR	GCP6_HUMAN
300	IAKQELIAHAREEASRVLSALSDRQ	GCP6_HUMAN
301	SYESMSEPPIAHLLRPVLPRAFAFP	GCP6_HUMAN
302	GSAVEIVGLSKSAVRWLELSKKNI	GDE_HUMAN
303	LRLETAPNISKDVIRQLLPKAPPLR	GDF8_HUMAN
304	VLGDIHTTLLSAVIPNAFRLVKRKP	GDL1_HUMAN
305	KDHAGVMGESNRLLSALIRHSSKSD	GDS1_HUMAN
306	FNQLTQSASEQGLAKAVASVARLVI	GEM4_HUMAN
307	GRQKLARFNAREFATLIIDILSEAK	GIT1_HUMAN
308	KPVYYALEGSVAIAGAVIRWLRDNL	GLPK_HUMAN
309	VGILSRRLQEALAAKEADAELGQL	GOA3_HUMAN
310	FLRRYPPIARVFVVIYMALLHLWVMI	GOA5_HUMAN
311	VLGLFWLLFASVVLILLLSWVGHVK	GPBA_HUMAN
312	QASWVRPGVLWDVALVAVAALGLAL	GPIX_HUMAN
313	FRLVSRDYASEAIKGAVVGIDLGT	GR75_HUMAN
314	EDFKAKKKELEBIVQPIISKLYGSA	GR78_HUMAN
315	GQPKRYKGFSIDVLDALAKALGFKY	GRD1_HUMAN
316	FOGKKNMTLAGRLAGPLFQTLIVAW	GRIP_HUMAN
317	QKGHKSQREELDAILFIFEKILQLL	GRIP_HUMAN
318	VKTQMQHGLISIAARTVITHLVNHL	GRIP_HUMAN
319	VPTWDTIRDEEDVLDLLOQLGVTS	GRIP_HUMAN

320	HEHIERRRKLYLAALPLAFEALIPN	GRLF_HUMAN
321	GVWSEKGQVEVFALRRLLQVVEEPQ	GRWD_HUMAN
322	MRPEDRMFHIRAVILRALSLAFLLS	HA2Q_HUMAN
323	SHTRGPEQQVKAILSELLQRENRL	HAPI_HUMAN
324	AMSKSRNPRLQTAAQELLEDLRTLE	HBP2_HUMAN
325	ALGHKRNSGVPAFLTPLLRLNIISL	HD_HUMAN
326	ENEDKWKRLSRQIADIILPMLAKQQ	HD_HUMAN
327	FGDAALYQSLPTLARALAQYLVVVS	HD_HUMAN
328	GLLKLQERVLNNVVIHLLGDEDPV	HD_HUMAN
329	NLSSRETSSLESFVRRVANIARTNA	HED1_HUMAN
330	GLPRPPMLLALLLATLLAAMLALLT	HEXB_HUMAN
331	DQRKMLLVGSRKAAEQVIQDALNQL	HIP1_HUMAN
332	GIALAYGSLLLMALLPIFFGALRSV	HM13_HUMAN
333	PNWKLKVSNLKMVLRSLVEYSQDVL	HOK2_HUMAN
334	GDQLAQLNTVFQALPTAAWGATLRA	HPS6_HUMAN
335	LLSSGRPKAVLQAVGQLVQKEQWDR	HPS6_HUMAN
336	QKHAQQQKVVNKLIQFLISLVQSNR	HSF1_HUMAN
337	AKHAQQQQVIRKIVQFIVTLVQNNQ	HSF2_HUMAN
338	LNAARRYLGIEDLAGKVFTSGLGG	HUTU_HUMAN
339	FEKMISGMYLGEIVRHILLHLTSLG	HXK3_HUMAN
340	IPANLSQNLEAAAATQVAVSVPKRR	I4G1_HUMAN
341	IFHKNVFHYLMAFLRELLKNSAKNH	I5P2_HUMAN
342	FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKG	ICE9_HUMAN
343	KNSEATLPIAVRFAKTLLANSSPFN	IF_HUMAN
344	SGKVSADNTVGRFLMSLVNQVPKIV	IF35_HUMAN
345	NPKIWNVHSVLNVLHSLVDKSNINR	IF3I_HUMAN
346	LHGVMEYDLSLRFLENALAVSTKYH	IF3X_HUMAN
347	ENGMYGKRKLLELIGHAVAHLKKAD	IFT2_HUMAN
348	YRRKDEPDKAIELLKKALEYIPNNA	IFT2_HUMAN
349	APSDPDVSAEEALKYLLHLVDVNE	IKAP_HUMAN
350	QLVKLLGASELPVTPALRAIGNIV	IMA2_HUMAN
351	SSNVENQLQATQAARKLLSREKQPP	IMA2_HUMAN
352	PLLSHQEVKVQTAALRAVGNIVTGT	IMA4_HUMAN
353	MRKEEPSNNVKLAATNALLNSLEFT	IMB1_HUMAN
354	PPEHTSKFYAKGALQYLVPILTQTL	IMB1_HUMAN
355	PYYDLFMPSLKHIVENAVQKELRLL	IMB3_HUMAN
356	TAAEEARQMAAVLLRRLLSSAFDEV	IMB3_HUMAN
357	LIAYRSRKRLETFLSLLVQNLAPAE	INPP_HUMAN
358	FVEPHKNMEVMGFLHGIFERLKQFL	IP11_HUMAN
359	LPVPQGPNPVVVVVLQQVFQLIQKVL	IP13_HUMAN
360	NRERQKLMREQNILKQIFKLLQAPF	IP3R_HUMAN
361	NRERQKLMREQNILAQVFGILKAPF	IP3S_HUMAN
362	EKRVDPTLEKYVLSVVLDTINAF	IP3T_HUMAN
363	NRERQKLMREQNILKQVFGILKAPF	IP3T_HUMAN
364	ETIQGLGAASAQFVSRLLPVLLSTA	IPO4_HUMAN

365	HPAQEHFPKLLGLLFPILLARERHDR	IPO4_HUMAN
366	LLRNPSSPRAKELAVSALGAIATAA	IPO4_HUMAN
367	LMASPTRKPEPQVLAALLHALPLKE	IPO4_HUMAN
368	SKALLKNRLLPPLLHTLFPIVAAEP	IPO4_HUMAN
369	YMQAVNRERERQVVMVLEALTGV	IPO4_HUMAN
370	DQYRQKEYVAPRVLQQAFFNYLNQGV	IPO8_HUMAN
371	ILADLNLVSFPFLGRALWAASRFT	IPO9_HUMAN
372	LGFFENLVFSIFEVHALLSENSKFKS	IPO9_HUMAN
373	PERWTNIPLLVKILKLIINELSNVM	IPO9_HUMAN
374	RTSEFTAAFVGRVLSTLISKAGREL	IPO9_HUMAN
375	LYNYASNQREEYLLRLFKTALQEE	IQG1_HUMAN
376	NRGARGQNALRQILAPVVKEIMDDK	IQG1_HUMAN
377	YQDLLQLQYEGVAVMKLFDRAKVN	IQG1_HUMAN
378	LYNYASNQREEYLLKLKFTALEEEE	IQG2_HUMAN
379	NRGARGQNTLRQLLAPVVKEIIDDK	IQG2_HUMAN
380	WSPRKLPSASTFLSPAFFPGSQTHS	IRA1_HUMAN
381	WLGCGVVPDAIVLAEEALDKAQEVL	IRBP_HUMAN
382	GKPLERKLILVQVIPVVARMIYEMF	IRF6_HUMAN
383	WRYMILLIFSLAFLASWLLFGIIFWV	IRKC_HUMAN
384	WRWMLLVFSASFVVHVLVFAVLWYV	IRKD_HUMAN
385	ALVIFEMPHLRDVALPALGAVLRGA	IRR_HUMAN
386	VGWIIAISLLVGILIFLLLAIVLLWK	ITA9_HUMAN
387	SNSIYPWSEVQTFLLRLVGKLFIDP	ITAG_HUMAN
388	PIWIIIVGSTLGGLLLLALLVLALWK	ITAH_HUMAN
389	QGFTYTATAIQNVVHRLFHASYGAR	ITAX_HUMAN
390	ARPRPRPLWVTVLALGALAGVGVGG	ITB3_HUMAN
391	LVVLLSVMGAILLIGLAALLIWKLL	ITB3_HUMAN
392	MAGPRPSPWARLLLAALISVLSGT	ITB4_HUMAN
393	AARQROETAAARAADALLKAVAASS	JPH4_HUMAN
394	LSTLRYADRAKRIVNHAVVNEDPNA	K13A_HUMAN
395	SNINKSLTTLGLVISSLADQAAGKG	K13A_HUMAN
396	LSTLRYADRAKHIVNNAVVNEDPNA	K13B_HUMAN
397	QENLSLIGVANVFLESFYDVKLQY	K13B_HUMAN
398	STSFRCGMGSGGLATGIAGGLAGMG	K1CR_HUMAN
399	GFDVNIVEEELGIISRANKHLFKSI	K21A_HUMAN
400	HQSVVYRKQAAMILNELVTGAAGLE	K406_HUMAN
401	SLVHRLTRDAPLAVLRAFKVLRTL	K406_HUMAN
402	YLSVKQPVKLQEAARSVFLHLMKVD	K406_HUMAN
403	KNVMEFLAPLKPVAIRIVRNAHGK	K682_HUMAN
404	GMRRGNMGHLTRIANAVVQNLERGP	K685_HUMAN
405	RQDVLHVLNNEEKVIQRLVELIHPSQ	K685_HUMAN
406	EELVSIPWKVLKVAKVIRALLRIL	K830_HUMAN
407	GFIATPFIKLFQLIYYLVVAILKNI	K830_HUMAN
408	TEILQHPERARDALRVLLHLVEKSL	KA43_HUMAN
409	RQDVVNWLNEEKIVQRLIEQIHPSK	KB15_HUMAN

410	ALHLATEMEELGLVTHLVTKLRANV	KBF2_HUMAN
411	NSQWRQDMSISLAALELLSGLAKVK	KC19_HUMAN
412	EKGFYTERDASRLIFQVLDAVKYLH	KCC1_HUMAN
413	EKGYYSERDAADAVKQILEAVAYLH	KCC4_HUMAN
414	LQEFNARRKLKAAVKAVVASSRLGS	KCC4_HUMAN
415	YALKRSFKELGLLLMYLAVGIFVFS	KCF1_HUMAN
416	LLRLASTPDLRRFARSALNLVDLVA	KCV2_HUMAN
417	STYFDMNLFLDIILKTVLENSGKRR	KE34_HUMAN
418	RGGVVRQYWSSSFLVDLLAVAAPVV	KE72_HUMAN
419	SALESTEEKLHDAASKLINTVEETT	KF11_HUMAN
420	QENEPTVGVIIPRVIQLLFKEIDKKS	KF4A_HUMAN
421	ELSNHQKKRATEILNLLLKDLGEIG	KF5C_HUMAN
422	EATAFGLGKEDAVLKVAVKMLKSTA	KFMS_HUMAN
423	KDKLKPGAAEDDLVLEVIMIGTVS	KFP3_HUMAN
424	MEGKLHDPQLMGIIIPRIARDIFNHI	KINN_HUMAN
425	SSAIIIDHIFASKAVVNAAIPAYHLR	KIST_HUMAN
426	YLEVGLSGLSSKAAKDLVGLRVVR	KNC1_HUMAN
427	LEKLGMDLASRLVTRVFKLLQNQI	LCAP_HUMAN
428	EAPAYHLILEGILILWIIRLLFSKT	LCB1_HUMAN
429	KTPSGIKLTINKLLDMAAQIAEGMA	LCK_HUMAN
430	ARGYVQDPFAALLVPGAARRAPLIH	LCM2_HUMAN
431	DSLYFRLKTAGRLARAAVWEVDFPD	LCM2_HUMAN
432	PLPSLRFLEELRLAGNALTYIPKGA	LGR5_HUMAN
433	FWKAFWNITEMEVLSSLANMASATV	LIPS_HUMAN
434	VTITLRLQVFQVAYVIIKAANAPR	LMA1_HUMAN
435	ERTNTRAKSLGEFIKELARDAEAVN	LMA2_HUMAN
436	ETQKEIAEDELVAEALLKKVKKLF	LMA2_HUMAN
437	QSQAHQQRGLFPAVLNLSNALITT	LMA2_HUMAN
438	NSARDAVRNLTEVVPQLLDQLRTVE	LMA4_HUMAN
439	VKLSNLSNLSHDLVQEAIDHAQDLQ	LMA4_HUMAN
440	GQPLPWELRLGLLSVLAATLAQAP	LMB2_HUMAN
441	ALDEKVRERLRMALERVAVLEEELE	LPA3_HUMAN
442	DNTKSQLAMSANFLGSVLTLLQKQH	LPC4_HUMAN
443	LLGGIKVKLLRGLLPNLVDNLVNRV	LPC4_HUMAN
444	KGNKSSYHRLSELVEHVFPLLSKEQ	LPN2_HUMAN
445	KNHKSTYERLGEVVELLFPVARGP	LPN3_HUMAN
446	TVLDQQQTPSRLAVTRVIQALAMKG	LPRC_HUMAN
447	PGPLPSLPLEPSLLSGVVQALRGRL	LR10_HUMAN
448	SKTEQPAALALDLVNKLIVYWDLYL	LR1B_HUMAN
449	AAKYRDHVTATQLIQKIINILTDKH	LRBA_HUMAN
450	VSNMSITERLEHALEKAAPLLREIF	LRBA_HUMAN
451	LSLLLLVTSVTLLVARVFQKAVDQS	LYII_HUMAN
452	DHLSQSKVIETQLAKPLFDALLRVA	LYST_HUMAN
453	SQAEVLVQKGSELVALRVALREARAT	LZT2_HUMAN
454	SRHHHGSSIAGGLVKGALSVAASAY	M172_HUMAN

455	GMAAGLYSELF TLLVSLVNRALKSS	M18A_HUMAN
456	AVVFSYIATLLYVHVAVFSLIRWKS	MAL_HUMAN
457	PPLNTIRDVSLKIAEKIVKDAYQEK	MAOX_HUMAN
458	TFNDDIQGTASVAVAGLLAALRTK	MAOX_HUMAN
459	KRKT'TAAGGESALAPSVFKQAKDKV	MAP2_HUMAN
460	KGKIKVIKKEGKAAEAVAAVGTGA	MAPB_HUMAN
461	FHPAVRNSSEVKFAVQAFALNSNN	MC3A_HUMAN
462	RRLGGLASQEPGAIIELFNSVLQFL	MC3A_HUMAN
463	PPAAARAGGSPTAVRSILTKEERPE	MCDL_HUMAN
464	RFSVVDMAALGGVLGALLLLALLGL	MCDL_HUMAN
465	RGTVARAGAGGVVVKDAAAPSQPLR	MCDL_HUMAN
466	AAFMKKYIHVAKI IKPVLTOESATY	MCM3_HUMAN
467	DLRRKNEKRANRLLNNAFEELVAFQ	MCM3_HUMAN
468	PFPWRFPGLLLAAMVLLLYSFSDA	MCP_HUMAN
469	DVSTLHVQKIISAISELLERLKS YG	MDN1_HUMAN
470	LATHRSTAKLLSVLAQVFTELAQKG	MDN1_HUMAN
471	SLRNFYSHSLSGAVSNVFKILQPNT	MDN1_HUMAN
472	VTSLAKAPAVQDLLTRLLQALHIDG	MDN1_HUMAN
473	QQLQKQLKEAEQILATAVYQAKEKL	MED4_HUMAN
474	RLRHHWAIALT TAVTSAFLAKVIL	MENT_HUMAN
475	MNMAKTSQTVATFLDELAQKLKPLG	MEPD_HUMAN
476	KDYTKVDRSAAYAARWVAKSLVKGK	METK_HUMAN
477	KDYTKVDRSAAYAARWVAKSLVKAG	METL_HUMAN
478	VSPLKHFVLAKKAITAIFDQLLEFV	MFN1_HUMAN
479	GYFPMIFRKAREFIEILFGISL TEV	MGC3_HUMAN
480	RKPRFMSAWAQVIIASILISVQLTL	MGR1_HUMAN
481	LKTAADRQAEDQVLRKLVLDVNQRD	MIL1_HUMAN
482	YLMVMIGMFSFIIVAILVSTVSKR	MIR1_HUMAN
483	SSQPLTLEHVRYFLYQLLRGLKYM H	MK07_HUMAN
484	GARLALDEHVQFLVYQLLRGLKYIH	MK11_HUMAN
485	VKKPAGPSISKPAAPAAAGAPPAK	MLEY_HUMAN
486	RGERLHMFRVGGLVFHAIGQLLPHQ	MLL2_HUMAN
487	WYVLVIIISDLMTIIGSILKMEIKAK	MLN2_HUMAN
488	SGKPRRKS NLP IFLPRVAGKLGRP	MLPH_HUMAN
489	KQKHFNEREASRVVRDVAAALDFLH	MNK1_HUMAN
490	KHLERRDAESLKLKEAIWEEKQGT	MOC3_HUMAN
491	VYRKMPHEVLGRIAVAVVKGLTYLW	MPK5_HUMAN
492	DLIFLRGIMESPIVRSLAKVIMVLW	MPP2_HUMAN
493	STATNPQNGLSQILRLVLQELSLFY	MPP4_HUMAN
494	ARRRLWGFSESLIRGAAGRSLYFG	MPPB_HUMAN
495	YYAKAFSKDLPRAVEILADIIONST	MPPB_HUMAN
496	HSVMDTLAVALRVAEEAIEEAISKA	MRIP_HUMAN
497	AVSSAHRAASLEAVSYAIDTLKAKV	MS2L_HUMAN
498	DEKKRRLMGLPSFLTEVARKLENL	MSH5_HUMAN
499	SPSLQEKLSFKAALIALYLLVFAV	MSRE_HUMAN

500	SVRPLEFTKVKTFVSRIIDTLDIGP	MTN3_HUMAN
501	SVRPQNFELVKRFVNQIVDFLDVSP	MTN4_HUMAN
502	EEPYRRRNQILSVLAGLAAMVGVAL	MTX1_HUMAN
503	VQLRRGLVGSRPVVTRVVIKAQGLV	MU5B_HUMAN
504	LVDKGTEDKVVDVVRNLVFHLKKG	MX1_HUMAN
505	KITINSHTTAGEVVEKLIRGLAMED	MY10_HUMAN
506	AGKQGLGPPSTPIAVHAAVKSKSLG	MYCD_HUMAN
507	VSSTVGAAVSALAGGALNGVFGRR	MYCT_HUMAN
508	GKTVNTRKVIQYFATIAVTGEKKKE	MYH4_HUMAN
509	VTKGQTVQQVYNAV GALAKAVYDKM	MYH1_HUMAN
510	VTKGQTVQEVSNAV GALAKAVYEKM	MYH2_HUMAN
511	VTKGQTVQQVYNAV GALAKAIYEKM	MYH4_HUMAN
512	GKTVNTRKVIQYFATIAVTGEKKKD	MYH8_HUMAN
513	VTKGQTVQQVYNAV GALAKAVYEKM	MYH8_HUMAN
514	EQLKRNSQRAAEALQSVLDAEIRSR	MYHD_HUMAN
515	QAAVQLALRAGQIRKALTEEKRV	MYO2_HUMAN
516	IVWRRFKWVIIGLLFLLILLFVAV	MYOF_HUMAN
517	PLDDLREDEVRLKYLFTLIRAGM	N107_HUMAN
518	IVLKNHHSRLSDLVNTAILIALNKR	N133_HUMAN
519	HEAQLSEKISLQAIQQLVRKSYQAL	N155_HUMAN
520	QGMSRVASVSQNAIVSAAGNIARTI	N155_HUMAN
521	YRRAAEKWEVAEVLLEV FYKLLRDY	N205_HUMAN
522	LFTFQKHVFSPIFIIGAFVAIFLGR	NAH7_HUMAN
523	TSGRRWREISASLLYQALPSSPDHE	NAL1_HUMAN
524	AEKQPPFTLIRSLLRKVLLPESFLI	NAL5_HUMAN
525	AENMSITAKLERALEKVAPLLREIF	NBEA_HUMAN
526	STVKIQNPMILKVVATLLKNSTPSA	NBEA_HUMAN
527	KGGVGKSTFSAHLAHLAEDENTQI	NBP1_HUMAN
528	FIQEFFGSPAFAALTSIAQKILDAT	NBP2_HUMAN
529	WRGPKKNALIKQFVSDVANGELDYL	NBP2_HUMAN
530	SARDLQNLMSWRFIMDLVSSLSRTY	NEP_HUMAN
531	SKLPKDQDAKHILEHVFFQVVEFK	NGD5_HUMAN
532	EPEPITASGSLKALRKLLTASVEVP	NIBA_HUMAN
533	GRVLYREDTSPAVLGLAARYVRAGF	NID2_HUMAN
534	RTKRLHWSRLFLGLMLIIGSTYQH	NKX1_HUMAN
535	YKFGSRHSAESQILKHLKLNLFKIF	NNMT_HUMAN
536	IVDNGVAPPARRLLRLVVRFAQVE	NPHN_HUMAN
537	GPVSARVIKALQVVDHAFGMLMEGL	NPP3_HUMAN
538	SPESDAPGPVYAAASLAVSWVLRV	NPR1_HUMAN
539	SPPALPLASSFTALLQAAYESQALR	NPR1_HUMAN
540	TMPHLSMQQVLLAAKQVLLYLSTV	NPR1_HUMAN
541	TQDMRLTFTLALFIAKAALQILKPE	NPR1_HUMAN
542	VLQQRIGELERQLLRKVAELEDEKS	NPX2_HUMAN
543	ISPLIQKSAANVVLFDIFVNILTHN	NRDC_HUMAN
544	VQGNVTSTESMDFLKYVVDKLNFKP	NRDC_HUMAN

545	GFKLLWILLLATLVGLLLQRLAARL	NRM2_HUMAN
546	VYVRDLGHVALYVVAAYVSVAYLGF	NRM2_HUMAN
547	RKPGNVLKTLEPILITIIAMSALGV	NRP1_HUMAN
548	DYVPIGPRFSNLVLQALLVLLKKAP	NSF_HUMAN
549	YMIHGDWFSKGAVGLLVHLHSGMV	NSMA_HUMAN
550	ILWSGWASNSNYALIGALRAVAQTI	NU1M_HUMAN
551	IRFLKGMGYSTHAAQQVLHAASGNL	NUB1_HUMAN
552	KQIQRTKRGLEILAKRAAETVVDPE	NUB1_HUMAN
553	ELLNMYVGESERAVRQVFQRAKNSA	NVL_HUMAN
554	RLSLVAGAYVAGLISALVRTVSAFT	O9Q1_HUMAN
555	WRRPGAGLARGFLHPAATVEDAAQ	ODBB_HUMAN
556	IVFNAHIKGVETIANDVVS LATKAR	ODP2_HUMAN
557	DFLNNPFKQENVLARMVASRITNYP	OFD1_HUMAN
558	NLRRDVYIRIASLLKTLLKTEEWVL	OFU2_HUMAN
559	AAETLLSSLGLLLLGLLLPASLTG	OS9_HUMAN
560	KREN PQLKQIEGLVKELLEREG LTA	OS9_HUMAN
561	KRVAYARVPSKDLLFSIVEETGKD	OTOF_HUMAN
562	TVPVFFNQAERRAVLQAARMAGLKV	OXRP_HUMAN
563	VGGATRVPRVQEVLLKAVGKEELGK	OXRP_HUMAN
564	DQKAYKEGKLQKALEDAFLAIDAKL	P2CG_HUMAN
565	TKYKMGDIANRVLRSLEASSSGV	P2G4_HUMAN
566	NRPSIPYAFSKFLLPIVRYLADQN	P4R1_HUMAN
567	HRSPQLLLELDNVISVLFQNSKERG	P52K_HUMAN
568	HRHMRTIREVRTLVTRVITDVYYVD	P531_HUMAN
569	AEQFAPPDIAPELLIKLVEAIEKKG	P85A_HUMAN
570	RQVQETLNLEPDVAQHLLAHSHWGA	PARC_HUMAN
571	VAMGEMEADVQALVRRARQLAESG	PARC_HUMAN
572	VELLTNQVGEKMVVVQALRLLYLLM	PARC_HUMAN
573	HPPYLVSKEMLSLVSGLLQPVPERR	PASK_HUMAN
574	STMSPLGSGAFGFVWTAVDKEKNKE	PASK_HUMAN
575	TSRRRNVTFSQQVANILLNGVKYES	PAST_HUMAN
576	LFTLDEQSGLLTVAWPLARRANSVV	PC16_HUMAN
577	KVTDHGKPTLSAVAKLIIRSVSGSL	PC17_HUMAN
578	SHINAATGTSASLVYRLVSKAGDAP	PCH9_HUMAN
579	NGETLVFEESNWFIIINVIKLVWRYG	PCL1_HUMAN
580	KADVNLSHSERGALQDALRRLGLF	PCN2_HUMAN
581	NQRKAAHSAELEAVLLALARIRRAL	PCN2_HUMAN
582	ISVQLKKTSEVDLAKPLVKFIQQTY	PD6I_HUMAN
583	NRSIAQMREATTLANGVLASLNLP	PD6I_HUMAN
584	PAKTMQGSEVVNVLSLLSNLDEVK	PD6I_HUMAN
585	VTEFNSQTSAKIFAARILNHL L LFV	PDA2_HUMAN
586	RLALFPGVALLLAAARLAAASDVLE	PDA3_HUMAN
587	YQGGRTGEAIVDAALSALRQLVKDR	PDA6_HUMAN
588	FSEMLAASFSAIVVAYAI AVSVGKV	PEND_HUMAN
589	RHKIPVPIPIEVIVTIIATAISYGA	PEND_HUMAN

590	ELLSKYIGASEQAVRDIFIRAQAAK	PEX1_HUMAN
591	GPGPPQLLVSRALLRLLALGSGAWV	PEX6_HUMAN
592	EFFTHLDKRSLPALTNIIKILRHDI	PH4H_HUMAN
593	FESIGKFGLALAVAGGVVNSALYNV	PHB_HUMAN
594	MDRSSKRRQVKPLAASLLEALDYDS	PHFE_HUMAN
595	TVTWGNYGKSYSVALYLVRQLTSSE	PIA4_HUMAN
596	TTAKRRLKQSVHLARRVLQLEKQNS	PIBF_HUMAN
597	RETAEPFLFVDEFLTLYFSRENSIW	PIG2_HUMAN
598	LVSTLVPLGLVLAVGAVVGVARAR	PIGR_HUMAN
599	EVARGKRAALFFAAVAIVLGLPLWW	PIGS_HUMAN
600	FTSFDQVAQLSSAARGLAASILFLL	PKD1_HUMAN
601	GAWARWLLVALTAATALVRLAQLGA	PKD1_HUMAN
602	LHAAVTLRLLEFPAGRALAALSVRP	PKD1_HUMAN
603	RMVASQAYNLTSALMRILMRSRVLN	PKD1_HUMAN
604	ESSTNREKYLKSVLRELVTYLLFLI	PKD2_HUMAN
605	LLHSRNEGATATYAAAVLFRISEDKN	PLAK_HUMAN
606	RQFRTGKVTVEKVIKILITIVEEVE	PLE1_HUMAN
607	RQFRTGRITVEKIIKIIITVVEEQE	PLE1_HUMAN
608	GPGPRFLLLLPLLLPPAASASDRPR	PLO3_HUMAN
609	DILKPGGGTSGGLLGGLLGKVTSVI	PLUN_HUMAN
610	VLRGLDITLVHDIVNMLIHGLQFVI	PLUN_HUMAN
611	LGQVPLIVGILLVLMVVLASLIYR	PM17_HUMAN
612	PDKRQILLQEEKLLLAVLKTSLIGM	PMS2_HUMAN
613	GLNPSLMAPSQFAAGGALLSLNPGT	PO21_HUMAN
614	ITLGYTQADVGLILGVLFQKVFQK	PO5L_HUMAN
615	ITLGYTQADVGLILGVLFQKVFQK	PO5M_HUMAN
616	LFSKYTNSKIPYFLLFLIFLITVYH	PP3A_HUMAN
617	DFVDRGFYSVETFLLLLALKVRYPD	PP4C_HUMAN
618	LLLARAASLSLGFLFLFFWLDRSV	PPAP_HUMAN
619	LVQIIKKTESDAALHPLLQEIYRDM	PPAR_HUMAN
620	QTWLSALRPSGPALSGLLSLEAEEN	PPCS_HUMAN
621	SMEGVTFLQAKQIALHALSLVGEKQ	PPO4_HUMAN
622	VVGTTTTTPSPSAIKAAKSAALQV	PRCC_HUMAN
623	NDLTRNRFFENPALWELLFHSIHDA	PRES_HUMAN
624	PPSGIHLSASRTLAPTLLYSSPPSH	PS11_HUMAN
625	KRLFNVDHRHVGMAVAGLLADARSLA	PSA3_HUMAN
626	RSNFGYNIPLKHLADRVAMYVHAYT	PSA3_HUMAN
627	VLYEDEGFRSRQFAALVASKVFYHL	PSD1_HUMAN
628	HLLRYGEPTLRRAPLALALISVSN	PSD2_HUMAN
629	GYGHMWSQNATNLVSSLLTLLKQLE	PTN5_HUMAN
630	KSLLDPKVAARLAVAEALTNLVFAL	PUR4_HUMAN
631	AQVGLGVGTSLLALGVIIIVLMYRR	PXB1_HUMAN
632	TRLLSMKGTLOKFVDDLQFQVILSTS	PXB1_HUMAN
633	LVVPLPGRDLLLVARGLAGKLSAGV	PXB3_HUMAN
634	GELSARQMHLARFLRMLLRLADEFG	RA51_HUMAN

635	IDLVSKLLYSRGLLIDLLIKSNVSR	RAE1_HUMAN
636	IDLVSKLLYSQGLLIDLLIKSDVSR	RAE2_HUMAN
637	AIFTGHSVVEDVAWHLLHESLFGS	RBB7_HUMAN
638	EHPAIRTLSARAAAAFVLANNIA	RBP6_HUMAN
639	MARGGRGRRGLGLALLLALVLA	RCN1_HUMAN
640	FEEYLRALDVNVALRKIANLLKPKD	RET1_HUMAN
641	MEDYLQALNISLAVRKIALLLKPKD	RET5_HUMAN
642	HSYVSVKAKVSSIAQEILKVVAEKI	RGE5_HUMAN
643	RLLWRLPAPVLVVLRYLFTFLNHLA	RHG4_HUMAN
644	PKPVVPKTNVKALVPNLLRAIEAGI	RHG5_HUMAN
645	YPRKFNETQIKQALRGVLESVKHNL	RHG5_HUMAN
646	KKNFESLSEAFSVASAAVLSHNRY	RIB2_HUMAN
647	VSTTVAKAMAREAAQRVAESSRLEK	RIP2_HUMAN
648	DPVLRKKGATPFILAAIAGSVKLL	RN5A_HUMAN
649	AHKATNKSSETLALLEILKHIAITE	RP1_HUMAN
650	LNYSVASQPKLAPFVIQALIQVIAKI	RP17_HUMAN
651	YGDNHFDNVLQAFVKMLLSVSHSDL	RP17_HUMAN
652	WVSVLLKKTEKAFLAHLASAVAEIR	RPL1_HUMAN
653	FMKLVGMPYLHEVLKPVISRVFEEK	RSG4_HUMAN
654	QHADPQTSRSLLLAKAVQSIGNLG	RSG4_HUMAN
655	INLKRTWEKLLLAARAIVAIENPAD	RSSA_HUMAN
656	SQGMVGQLAARRAAGVVLEMIREGK	RUV2_HUMAN
657	EQGKRNFASKAMSVAKQVFNSLTEYI	RYR1_HUMAN
658	IDEASWMKRLAVFAQPIVSRARPEL	RYR1_HUMAN
659	NYLSRNFYTLRFLALFLAFAINFIL	RYR1_HUMAN
660	QAGKGEALRIRAILRSLVPLEDLVG	RYR1_HUMAN
661	RVRRRLRRLTAREAATAVAALLWAAV	RYR1_HUMAN
662	TAAAGATARVVAAAGRALRGLSYRS	RYR1_HUMAN
663	VEKSPHEQEIKFFAKILLPLINQYF	RYR1_HUMAN
664	ARNFYNMRLALFVAFAINFILLFY	RYR2_HUMAN
665	DTPSIEKRFAYSFLQQLIRYVDEAH	RYR2_HUMAN
666	EQGQRNFASKAIQVAKQVFNTLTEYI	RYR2_HUMAN
667	GEHFPYEQEIKFFAKVVLPLIDQYF	RYR2_HUMAN
668	EESGMWKEILNLLYKLLAALIRGN	RYR3_HUMAN
669	HYLARNFYNLRLALFVAFAINFIL	RYR3_HUMAN
670	QTGKGEAIRIRSILRSLVPTEDLVG	RYR3_HUMAN
671	TEKSPRDQEIKFFAKVLLPLVDQYF	RYR3_HUMAN
672	TLYQQARLHERGAAEMVLQMSASK	RYR3_HUMAN
673	FLSQGGLAGIFAALAMLLSMASGVD	S292_HUMAN
674	SNSLAYNMANGAVIHLALKERGGR	S3A1_HUMAN
675	LQLLSGHPPASEAVASVLSFLYDKK	S3T2_HUMAN
676	QISLEGYEKALEFATLAARLSTVTG	S3T2_HUMAN
677	HTSTLAAMKMTALVNVALNLSINM	SA2_HUMAN
678	APPVAAGVGAVLAAGALLGLVAGAL	SBN1_HUMAN
679	DMVKSKWGLALAAVTVLSSLMSV	SCAP_HUMAN

680	GMTWSHGLSVSKVLHKAFVEVTEEG	SCC2_HUMAN
681	AGKSGGSAGEITFLEALARSESKRD	SEN6_HUMAN
682	ILQKYIERIITRFAPMLVPYIWQNQ	SGT1_HUMAN
683	DAQLDYHRQAVQILDELAEKLRMR	SH31_HUMAN
684	FKKDPPLAAVTTAVQELLRLAQHP	SKIW_HUMAN
685	RGLGVHHSGLPILKEIVEMLFSG	SKIW_HUMAN
686	RRIDLSNNQIAETAPDAFQGLRSLN	SLT1_HUMAN
687	SSAGPVRPELWLLWAAAWRLGASA	SLT1_HUMAN
688	VTVLFAVLVSGALIILVASPLRALR	SM4A_HUMAN
689	PGGMNRKTQETAVAMHVAANSIQNR	SMF1_HUMAN
690	TSTWLDDVEERLRFVATALLPEETET	SNE1_HUMAN
691	INSQLARHTSPSVISDLFTDIKKGH	SNE2_HUMAN
692	QHVDQRRQGLEDFLRKVLQNALLLS	SNXA_HUMAN
693	PDIPERWKDIGNVIKRALVKVTSVP	SOR3_HUMAN
694	LQHRHRLPDLQAILRRILNEEETSP	SP90_HUMAN
695	HNNRRLQAESESAATRLLLASKQLG	SPA1_HUMAN
696	RAAPRGPGAELQAAGSLVWGVRAAP	SPA1_HUMAN
697	RNVFFSPMSISSALAMVFMGAKGST	SPB8_HUMAN
698	QLAKQKAQAEKLLNNVISKLLPTN	SPC2_HUMAN
699	SLLDKHSQIINKFVNSVINTLKSTV	SPC2_HUMAN
700	IQSLTMYPRLGGMNLSRLIMKQ	SPK_HUMAN
701	VHPAISSINLTALGSLANIARQRP	SPK_HUMAN
702	PFYDPEGGSITQVARVVIERIARKG	SPO1_HUMAN
703	PLKLSRTPALLALALPLAAALAFSD	SPO1_HUMAN
704	MVGPAPRRRLRPLAALALVLALAPG	SPUF_HUMAN
705	KTGSFKIRGALNAVRSLVPDALERK	SRR_HUMAN
706	KHGPGRWVLA AVLIGLLLVLGIG	ST14_HUMAN
707	SNRGLTKENLVFLAQKLFNNSSSHL	ST5B_HUMAN
708	DASKALLGRLTTLIELLLPKLEEWK	STA2_HUMAN
709	KGVDLRNAQVTELLQRLHRAFFVE	STA2_HUMAN
710	PAAGLGPGHARHVLRLVNQSVQDG	STRC_HUMAN
711	PDNTGRGYVLRRLRRRAVRYAHEKL	SYA_HUMAN
712	RRPIMSNHTATHILNFALRSVLGEA	SYA_HUMAN
713	FLAGETESLADIVLWGALYPLLQDP	SYM_HUMAN
714	YHQLLEKVRIRDALRSILTISRHGN	SYM_HUMAN
715	FLKGVLVFLEQALIQYALRTLGSRG	SYS_HUMAN
716	WEVGVYAAGALALLGIAAVSLWKLW	SYTC_HUMAN
717	WLYLQDQNKAAADAVGEILLSLSYLP	SYTC_HUMAN
718	TRPWLLDPKILKFVVFIVAVLLPVR	T10D_HUMAN
719	TWKDRFPGYLMNFASILFMIALTFS	T16B_HUMAN
720	EVVKLHPHELNNLLSKVLIYLRAN	T172_HUMAN
721	YALAVRQDVINTLLPKVLTRIIEGL	T172_HUMAN
722	MADPDVLTEVPAALKRLAKYVIRGF	T2EA_HUMAN
723	FSQGKMYGYVDTLLTMLAMLLKVAM	T3C3_HUMAN
724	KLQEIIMHVIWAALAFAAIQLLGML	T4S8_HUMAN

725	DTEFAKQTS L D A V A Q A V V D R V K R I H	TAB1_HUMAN
726	LEFAIMRIEALKLARQIALASRSHQ	TAC2_HUMAN
727	RANTHIRDFLQVFIYRLFWSKDRP	TAF1_HUMAN
728	DIERPTYTNLNLRLISQIVSSITASL	TBA8_HUMAN
729	QTIIAGWREATKAAREALLSSAVDH	TCPB_HUMAN
730	LDTYLGKYWAIKLATNAAVTVLRVD	TCPQ_HUMAN
731	NFGAFSINPAMMAAAQAALQSSWGM	TDBP_HUMAN
732	QKLYIPRSTATAALGAAARLATSRS	TDR5_HUMAN
733	EEEEKVSQPEVGAAIKIIRQLMEKF	TE2I_HUMAN
734	LSKKLIYFQLHRALKMTVDPVEPHG	TF1B_HUMAN
735	GSRGTTAGSSGDALGKALASTYSPD	TFE2_HUMAN
736	LPSIPAQPISADIASRLRLKLGKPV	TFR2_HUMAN
737	NLHKVLQGRLPVAQAQAVLAGQLL	TFR2_HUMAN
738	QRDAWGPGAAKSAVGTAILELVRT	TFR2_HUMAN
739	EAFSHFTKIITPAITRVVDFAKKLP	THB2_HUMAN
740	EGQSQQFSVSENLLEAIRAIFPSR	THYG_HUMAN
741	PASLGKWKKEPELAAFVFKTAVVLV	TIAM_HUMAN
742	RLPSSWALFSPLLAGLALLGVGPVP	TIP_HUMAN
743	AIKKKLQVRLLEHAAKQAAASATQTI	TLN1_HUMAN
744	GQLLRGVGAAATAVTQALNELLOHV	TLN1_HUMAN
745	QQLAAFSKRVAGAVTELIQAAEAMK	TLN2_HUMAN
746	SELLKQVSAAASVVSQALHDLLOHV	TLN2_HUMAN
747	KVLNLAYNKINKIADAEFYGLDNLQ	TLR5_HUMAN
748	GREKFKSRGVGELARLALVISELEG	TM26_HUMAN
749	QGHQFLREREEHLEQLAKLEQELT	TM26_HUMAN
750	LKISPVAPDADAVAAQILSLLPLKF	TMS3_HUMAN
751	RKARGYLRLVPLFVLLALLVLASAG	TMS6_HUMAN
752	YAHPOQKVAVYRALQAALAESGGSP	TRAD_HUMAN
753	YVNYVLSEKSSSTFLMKAAKVVESK	TRF1_HUMAN
754	AAPAPGAPLLPLLLPALAARLLPPA	TRFM_HUMAN
755	THIKAPEQQVKNILNELFQRENRLV	TRIO_HUMAN
756	PHMRKNIKGIHTLLQNLAKASPVYL	TRKB_HUMAN
757	QHALRNRRLLRKVIKAAALEEHNA	TSC1_HUMAN
758	KSDRLISLQSASVVYDLLTIALGRR	TT7B_HUMAN
759	QMKAKRTKEAVEVLKKALDAISHSD	TTC6_HUMAN
760	LARQINHPPELHMVLSNLA AVL MHRE	TTCJ_HUMAN
761	VAPHGRGPGLPLLAALAWFSRPAA	TTCJ_HUMAN
762	HSRTSWVPVVLGVLTAALVTAAALAL	TYO3_HUMAN
763	PLPLPPPPRLGLLLAALASLLLPES	TYO3_HUMAN
764	WSWLLGAAMVGAVLTALLAGLVSL	TYRO_HUMAN
765	LLHDDRGPVLEALVARAIRNIEMTQ	U520_HUMAN
766	RGGGQIIP TARRVVYSAFLMATPRL	U5S1_HUMAN
767	LFYQDKLSLHQLEVLALLDKDV	UB24_HUMAN
768	YGS GPKRFP LVDVLQYALEFASSKP	UB25_HUMAN
769	NRKFVDPSAALDLLKGAFRSSEEQQ	UB28_HUMAN

770	KIEKVFSKLLYPIVRGAALSVLKYM	UB35 HUMAN
771	RFLNLLMNDAlFLLDEAIQYLSKIK	UB4A HUMAN
772	DIPSADRHKSCLIAGKIIPAIATTT	UBA1 HUMAN
773	GIPPVNRAQSKRIVGQIIPAIATTT	UBAL HUMAN
774	PVDKVAAMREFRVLHTALHSSSSYR	ULSB HUMAN
775	AARFAKTKEEVEAAKAAALLAKQAE	UXD2 HUMAN
776	HLPEKQDTFAEKLVTQIIKNLQVKI	V13A HUMAN
777	MLNRQDPFTVHMAARIIAKLAAWGK	VATH HUMAN
778	ALIEGKNKTVSTLVIQAANVSALYK	VGR2 HUMAN
779	EVITDNLPGSIRAVVNIFLVAKALL	VIAA HUMAN
780	VRWLQESRRSRKLILFIVFLALLLD	VMT2 HUMAN
781	FVIATTRQRLFQFIGRAAEGAEAQG	VP18 HUMAN
782	WIEMGSRLDARQLIPALVNYSQGGE	VP18 HUMAN
783	MRDVNKKFSVRYFLNLVLVDEEDRR	VP26 HUMAN
784	NSFKMKMSVILGIIHMLFGVSLSLF	VPP1 HUMAN
785	NSYKMKMSVILGIVQMVFVILSLF	VPP4 HUMAN
786	MQREGGPSQIGDALGFAVRYLTSEM	VWF HUMAN
787	KDTPSGISKVRKILFTLAKQSKALG	WD10 HUMAN
788	LVGLKNGQILKIFVDNLFAIVLLKQ	WD10 HUMAN
789	SFEQGGSEFVPVVVSRLVLRMSRR	WD10 HUMAN
790	IPADPEAGGIGRVVNGAFMVLKGHR	WD22 HUMAN
791	RQNKDERYSIKDLLNHAFQEEETGV	WNK1 HUMAN
792	RKTSKSKLKAGKLLNPLVRQLKVVA	WNK2 HUMAN
793	RTDKNERFTIQDLLAHAFREERG	WNK4 HUMAN
794	TAFGADTEGSQWIIIGYLLQKVISNL	XPO4 HUMAN
795	LGLNDETMVLSVFIGKIITNLKYWG	XPO7 HUMAN
796	LNYLATRPKLATFVTQALIQLYARI	XPO7 HUMAN
797	AMFVEYRKQLKLLLDRLAQVSPELL	XPOT HUMAN
798	QNWQTTRFMEVEVAIRLLYMLAEAL	XPOT HUMAN
799	FPAATSGRMVEAFARRALWDAGLNY	XPP2 HUMAN
800	LLKASHVRDAVAVIRYLVWLEKNVP	XPP2 HUMAN
801	SILTQPHLYSPVLISQLVQMASQLR	Y310 HUMAN
802	ISIGTIYFRAHKLVLAAASLLFKTL	Y478 HUMAN
803	RDVLRVQGVSLTALRLLLDAYSGR	Y711 HUMAN
804	QLEGLNATARNLLGKLINILLAVM	Y779 HUMAN
805	PPLIVDRERLKKLLDLLVDKSNLA	YC40 HUMAN
806	EDTKEKRTIIHQAIKSLFPGLTKT	YI97 HUMAN
807	DQKTNLPEYLQTLNLTLAPLLLFRA	Z294 HUMAN
808	RSREHGTLSLIIAKLILSRSSISSD	Z294 HUMAN
809	VLASAYTGRLSMAAADIVNFLT VGS	Z297 HUMAN
810	GRNKMDPPRSSIFLQEVITTVYGYK	ZAN HUMAN
811	VDLAYSNYHVQFLEALLRNSAAPS	ZBT8 HUMAN
812	LKLRSLRVNVGQLLAMIVPDLDLQQ	ZCW3 HUMAN
813	ELQKQAEELMEFEIALKALSVLRYIT	ZM10 HUMAN
814	DALHMLTDLSAIILTLLALWLSSKS	ZNT4 HUMAN

815	MDDEENYSAASKAVRQVLHQLKRLG	ZW10_HUMAN
-----	---------------------------	------------

Bildlegenden

Figur 1.

Identifizierung von Peptiden, die die Interaktion von AKAP-Proteinen mit der PKA hemmen. Eine Bibliothek von Peptiden, die von der PKA-Bindungsdomäne des AKAP18 δ abgeleitet wurden, wurde auf einer Membran synthetisiert. Die Membran wurde mit radioaktiv markierten regulatorischen RII α - und RII β -Untereinheiten der PKA inkubiert (RII-overlay-Experiment). Jeder schwarze Punkt repräsentiert ein Peptid, an das die RII-Untereinheiten gebunden haben (detektiert mit einem Phosphoimager). Die Aminosäuresequenzen der Peptide lassen sich anhand der angegebenen Kürzel (Einbuchstabenkodierung) ablesen. Vertikal: Sequenz der wildtypischen PKA-Bindungsdomäne von AKAP18 δ ; horizontal: die 20 Aminosäuren, die für die Substitution der wildtypischen Sequenz eingesetzt wurden.

Figur 2

Identifizierung von Peptiden, abgeleitet von AKAP18 δ , die die Interaktion von AKAP-Proteinen mit den regulatorischen RII α - und RII β -Untereinheiten der PKA hemmen. A. Peptide, die von der PKA-Bindungsdomäne des AKAP18 δ abgeleitet wurden, wurden auf zwei Membranen synthetisiert. Die Membranen wurden mit radioaktiv markierten regulatorischen RII α - (obere Reihe) oder RII β -Untereinheiten (untere Reihe) der PKA inkubiert (RII-overlay-Experiment). Jeder schwarze Punkt repräsentiert ein Peptid, an das die RII-Untereinheiten gebunden haben (detektiert mit einem Phosphoimager). Für die Quantifizierung wurden die Signale

densitometrisch ausgewertet und auf das Signal, das für AKAP18 δ -wt erhalten wurde, bezogen. B: Die Aminosäuresequenzen der Peptide (Einbuchstabenkodierung), die in A angegeben sind.

Figur 3A

Peptide, abgeleitet von AKAP18 δ , die RII α - und RII β -Untereinheiten der PKA unterschiedlich stark binden. A. Die Peptide 1-19, die von der PKA-Bindungsdomäne des AKAP18 δ abgeleitet wurden, wurden auf zwei Membranen synthetisiert. Die Membranen wurden mit radioaktiv markierten regulatorischen RII α - (obere Reihe) oder RII β -Untereinheiten (untere Reihe) der PKA inkubiert (RII-overlay-Experiment). Jeder schwarze Punkt repräsentiert ein Peptid, an das die RII-Untereinheiten gebunden haben (detektiert mit einem Phosphoimager). Für die Quantifizierung wurden die Signale densitometrisch ausgewertet und auf das Signal, das für AKAP18 δ -wt erhalten wurde, bezogen. Das Peptid 7 ist aufgrund des großen Unterschieds in der Bindung an die beiden RII-Untereinheiten durch rote Schrift hervorgehoben. B: Die Aminosäuresequenzen der Peptide (Einbuchstabenkodierung), die in A mit 1-19 bezeichnet sind.

Figur 4

Unterschiedliche Peptide, abgeleitet von AKAP18 δ , binden RII α - und RII β -Untereinheiten der PKA unterschiedlich stark. Zwei Bibliotheken von Peptiden, die von dem Peptid 7 aus Figur 3 abgeleitet wurden, wurden auf zwei Membranen synthetisiert. Die Membranen wurden mit radioaktiv markierten regulatorischen RII α - (linke Seite) oder RII β -Untereinheiten der PKA (rechte Seite) inkubiert (RII-overlay-Experiment). Jeder schwarze Punkt repräsentiert ein

Peptid, an das die RII-Untereinheiten gebunden haben (detektiert mit einem Phosphoimager). Die Aminosäuresequenzen der Peptide lassen sich anhand der angegebenen Kürzel (Einbuchstabenkodierung) ablesen. Vertikal: Sequenz des Peptids 7; horizontal: die 20 Aminosäuren, die für die Substitution der wildtypischen Sequenz eingesetzt wurden. Horizontale und vertikale Reihen sind zusätzlich durch arabische Zahlen beschriftet. Diese Koordinaten erleichtern die Zuordnung, so bedeutet zum Beispiel 10/11: Reihe 10 Peptid 11. Die unten aufgelisteten Peptide werden entsprechend ihrer Bindung an RII α mit A18 δ RII α Hs1 und 2 bzw. entsprechend ihrer Bindung an RII β mit A18 δ RII β Rn1 bezeichnet.

Fig. 5: Identifizierung von Peptiden, die AKAP-PKA-Interaktionen hemmen. Kandidatenpeptide wurden auf einer Membran synthetisiert und mit radioaktiv markierten regulatorischen RII-Untereinheiten der PKA inkubiert (RII-overlay-Experiment). Alle schwarzen Punkte repräsentieren Peptide, die regulatorische PKA-Untereinheiten gebunden haben (detektiert mit einem Phosphoimager).

Fig. 6. Einfluß von Wasserstoffbrücken auf die Bindung zwischen Peptiden und RII(α)-Untereinheiten der PKA. (A,B) Vergleichende schematische Darstellung der Interaktion zwischen RII(α) und den Peptiden AKAP18(δ)-wt oder AKAP18(δ)-L314E sowie zwischen RII(α), Ht31 oder AKA_{ts}. RII α ist als Rechteck und durch ausgewählte Aminosäuren, die Peptide sind anhand ihrer Aminosäure-Sequenz dargestellt. Aminosäuren als Partner einer Wasserstoffbrückenbindung, sind durch eine unterbrochene Linie miteinander verbunden. Aminosäuren der Peptide, die sich in Positionen für hydrophobe

Molekülkontakte befinden sich grün unterlegt (Pos. der Aminosäuren von AKAP18(delta)-wt im Vergleich zum Protein sind angegeben). (C,D) Um den Einfluß der Aminosäuren für die Bindungsstärke zu untersuchen, wurden Alanin-substituierte Peptide auf Membranen synthetisiert, mittels RII overlay auf RII(alpha)-Bindung überprüft und densitometrisch quantifiziert. Die Peptide, ausgehend von AKAP18(delta)-L314E, wurden in allen möglichen Kombinationen für die Aminosäuren, die Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können (vgl. A) substituiert. Die Quantifizierung für alle Peptide, sortiert nach der Affinität ist in C dargestellt. Die Quantifizierung für alle Einzelsubstitutionen (wie angegeben), sowie representative „Spots“ aus einem RII Overlay (darüber) sind in D dargestellt.

Referenzen

Alto, N. M., Soderling, S. H., Hoshi, N., Langeberg, L. K., Fayos, R., Jennings, P. A., Scott, J. D. Bioinformatic design of A-kinase anchoring protein-in silico: a potent and selective peptide antagonist of type II protein kinase A anchoring. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 4445-4450, 2003.

Bregman, D. B., Bhattacharyya, N., Rubin, C. S. High affinity binding protein for the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase II-B. J. Biol. Chem. 264, 4648-4656, 1989.

Burns-Hamuro, L. L., Ma, Y., Kammerer, S., Reineke, U., Self, C., Cook, C., Olson, G. L., Cantor, C. R., Braun, A., Taylor, S. S. Designing isoform-specific peptide disruptors of protein kinase A localization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 4072-4077, 2003.

Frank, R. Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. Tetrahedron 48, 9217-9232, 1992.

Fraser, I. D., Tavalin, S. J., Lester, L. B., Langeberg, L. K., Westphal, A. M., Dean, R. A., Marrion, N. V., Scott, J. D. A novel lipid-anchored A-kinase Anchoring Protein facilitates cAMP-responsive membrane events. EMBO J. 17, 2261-2272, 1998.

Henn, V., Edemir, B., Stefan, E., Wiesner, B., Lorenz, D., Theilig, F., Schmitt, R., Vossebein, L., Tamma, G.,

- Beyermann, M., Krause, E., Herberg, F. W., Valenti, G., Bachmann, S., Rosenthal, W., Klusmann, E. Identification of a novel A-kinase anchoring protein 18 isoform and evidence for its role in the vasopressin-induced aquaporin-2 shuttle in renal principal cells. J. Biol. Chem. JBC published March 22, 2004 as doi:10.1074/jbc.M312835200
- Hulme J. T., Lin, T. W., Westenbroek, R. E., Scheuer, T., Catterall, W. A. Beta-adrenergic regulation requires direct anchoring of PKA to cardiac CaV1.2 channels via a leucine zipper interaction with A kinase-anchoring protein 15. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100,13093-13098, 2003.
- Klusmann, E., Maric, K., Wiesner, B., Beyermann, M., Rosenthal, W. Protein kinase A anchoring proteins are required for vasopressin-mediated translocation of aquaporin-2 into cell membranes of renal principal cells. J. Biol. Chem. 274, 4934-4938, 1999.
- Klusmann, E. Protein kinase A. Online pharmacology reference database. Elsevier Science Inc., Amsterdam, The Netherlands. Im Druck.
- Kramer, A., Schneider-Mergener, J. Synthesis and screening of peptide libraries on continuous cellulose membrane supports. Meth. Mol. Biol. 87, 25-39, 1998.
- Tasken, K, Aandahl, E. M. Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. Physiol. Rev. 84, 137-167, 2004.

Patentansprüche

1. Proteinkinase A/Proteinkinase A-Ankerprotein-Entkoppler, dadurch gekennzeichnet, dass die Entkoppler entweder (i) von einem AKAP18 δ oder (ii) von einem von AKAP18 δ verschiedenem Protein abgeleitet sind und gemäß (i) mindestens 8 H-Brücken bildende Aminosäuren oder gemäß (ii) die allgemeine Formel (1) aufweisen
xxxxxxxx[AVLISE]xx[AVLIF][AVLI]xx[AVLI][AVLIF]xx[AVLISE]xxxx(1),
wobei X eine beliebige der 20 biogenen Aminosäuren sein kann.
2. Isoliertes Nukleinsäuremolekül ausgewählt aus der Gruppe umfassend
 - a) ein Nukleinsäuremolekül umfassend eine Nukleotidsequenz kodierend mindestens eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID Nr. 1 - 39,
 - b) ein Nukleinsäuremolekül, welches mit einer Nukleotidsequenz gemäß a) unter stringenten Bedingungen hybridisiert,
 - c) ein Nukleinsäuremolekül umfassend eine Nukleotidsequenz, die eine ausreichende Homologie aufweist, um zu einer Nukleotidsequenz gemäß a) oder b) funktionsanalog zu sein,
 - d) ein Nukleinsäuremolekül, das infolge des genetischen Codes zu einer Nukleotidsequenz gemäß a) - c) degeneriert ist und/oder
 - d) ein Nukleinsäuremolekül gemäß einer Nukleotidsequenz nach a) - d), welches durch Deletionen, Additionen, Substitutionen, Translokationen, Inversionen und/oder Insertionen modifiziert und funktionsanalog zu einer Nukleotidsequenz gemäß a) bis d) ist.

3. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die unter c) angegebene Nukleotidsequenz mindestens 60 %, vorzugsweise 70 %, bevorzugt 80 %, ganz besonders bevorzugt 90 % homolog zu einer der unter a) angegebenen Nukleotidsequenz ist.
4. Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass es eine genomische DNA, eine cDNA und/oder eine RNA ist.
5. Vektor umfassend ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 2 bis 4.
6. Wirtszelle umfassend den Vektor gemäß Anspruch 5.
7. Organismus umfassend ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 2 bis 4, einen Vektor gemäß Anspruch 5 und/oder eine Wirtszelle gemäß Anspruch 6.
8. Organismus nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Organismus eine transgene Maus oder Ratte ist, wobei die Maus oder Ratte vorzugsweise durch das Vorhandensein des Nukleinsäuremoleküls gemäß einem der Ansprüche 2 bis 4, des Vektors gemäß Anspruch 5 und/oder der Wirtszelle gemäß Anspruch 6 Diabetes insipidus entwickelt.
9. Polypeptid, kodiert durch ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 2 bis 4.

10. Polypeptid nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet, dass
- a) das Polypeptid eine Aminosäuresequenz nach SEQ ID 1 bis 39 umfasst,
 - b) das Polypeptid nach a) durch Deletionen, Additionen, Substitutionen, Translokationen, Inversionen und/oder Insertionen modifiziert und funktionsanalog zu einem Polypeptid nach a) ist und/oder
 - c) das Polypeptid ein Polypeptid umfasst, das eine ausreichende Homologie aufweist, um zu einem Polypeptid nach a) oder b) funktionsanalog zu sein.
11. Erkennungsmolekül gerichtet gegen ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 2 bis 4, einen Vektor gemäß Anspruch 5, eine Wirtszelle gemäß Anspruch 6 und/oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 1, 9 oder 10.
12. Erkennungsmolekül nach Anspruch 11,
dadurch gekennzeichnet, dass
es ein Antikörper, ein Antikörperfragment und/oder ein Antisense-Konstrukt ist, insbesondere ein RNA-Interferenzmolekül.
13. Pharmazeutische Zusammensetzung,
dadurch gekennzeichnet, dass
sie ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 2 bis 4, ein Vektor gemäß Anspruch 5, eine Wirtszelle gemäß Anspruch 6, ein Polypeptid gemäß Anspruch 1, 9 oder 10 und/oder ein Erkennungsmolekül gemäß einem der Ansprüche 11 oder 12, gegebenenfalls mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger, umfasst.
14. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 13,

dadurch gekennzeichnet, dass diese ein Aquaretika ist.

15. Kit,

dadurch gekennzeichnet, dass er ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 2 bis 4, ein Vektor gemäß Anspruch 5, eine Wirtszelle gemäß Anspruch 6, ein Polypeptid gemäß Anspruch 1, 9 oder 10, ein Erkennungsmolekül gemäß einem der Ansprüche 11 oder 12 und/oder die pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 13 oder 14 umfasst.

16. Verfahren zur Modifikation, insbesondere einer Inhibition einer AKAP-PKA-Interaktion umfassend die Schritte

- a) Bereitstellung eines Nukleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 2 bis 4, eines Vektors nach Anspruch 5, einer Wirtszelle nach Anspruch 6 und/oder eines Polypeptids nach Anspruch 1, 9 oder 10 und
- b) In-Kontakt-Bringen mindestens eines Erzeugnisses gemäß a) mit einer Zelle, einer Zellkultur, einem Gewebe und/oder einem Zielorganismus.

17. Verfahren nach Anspruch 16,

dadurch gekennzeichnet, dass die Modifikation an einer regulatorischen RII-Untereinheit der PKA erfolgt.

18. Verfahren nach Anspruch 17,

dadurch gekennzeichnet, dass die RII-Untereinheiten RII α - und/oder RII β -Untereinheiten sind.

19. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 2 bis 4, eines Vektors nach Anspruch 5, einer Wirtszelle nach Anspruch 6, eines Organismus nach Anspruch 7 oder 8, eines Polypeptids nach Anspruch 1, 9 oder 10, eines Erkennungsmoleküls nach Anspruch 11 oder 12, einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach Anspruch 13 oder 14 und/oder eines Kits nach Anspruch 15 zur Modifikation, insbesondere einer Inhibition, einer AKAP-PKA-Interaktion.
20. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass die Interaktion in einer Zelle, einer Zellkultur, einem Gewebe und/oder einem Zielorganismus durchgeführt wird.
21. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Organismus nach Anspruch 7 oder 8 als Modell für die gewebs- und/oder zellspezifische AKAP-PKA-Interaktion verwendet wird, insbesondere als Modell für Diabetes insipidus.
22. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass durch die Modifikation die Vasopressin-induzierte Umverteilung von AQPII modifiziert wird, insbesondere verhindert wird.
23. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Polypeptid gemäß Anspruch 1, 9 oder 10 und/oder die pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 13 oder 14 als Wasserverlust-verursachende Mittel eingesetzt werden, insbesondere als Aquaretika.

24. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Interaktion der $RII\alpha$ - oder $RII\beta$ -Untereinheiten des PKA mit AKAP modifiziert, insbesondere inhibiert wird.
25. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass die Untereinheiten humanem oder murinem Ursprungs sind.

Abb. 5A, Block1

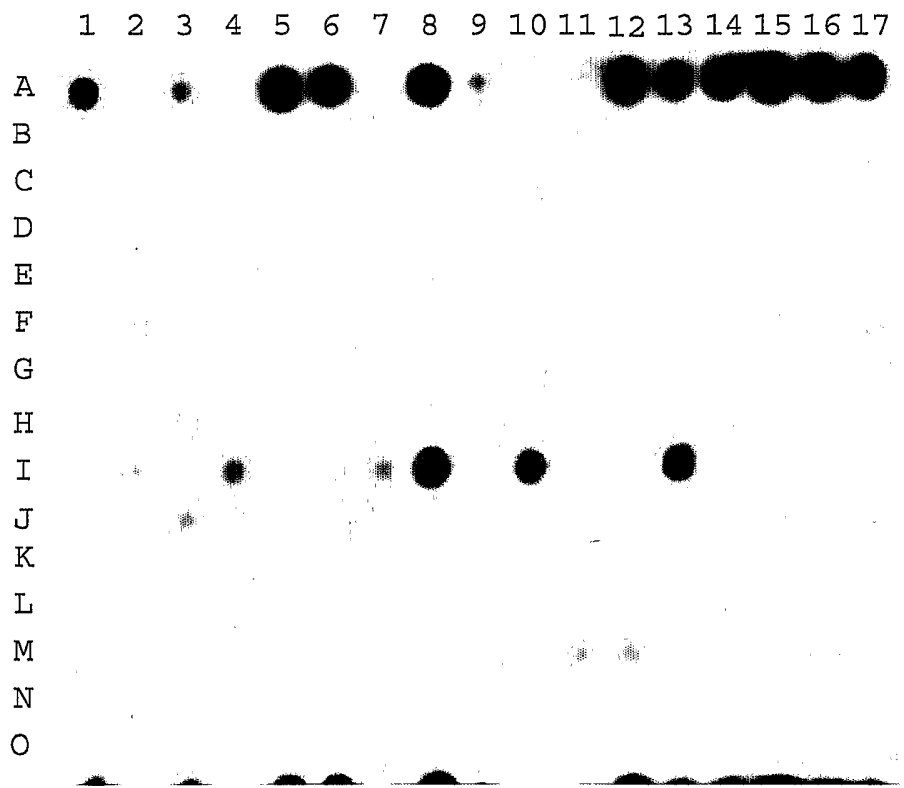


Abb. 5B, Block2

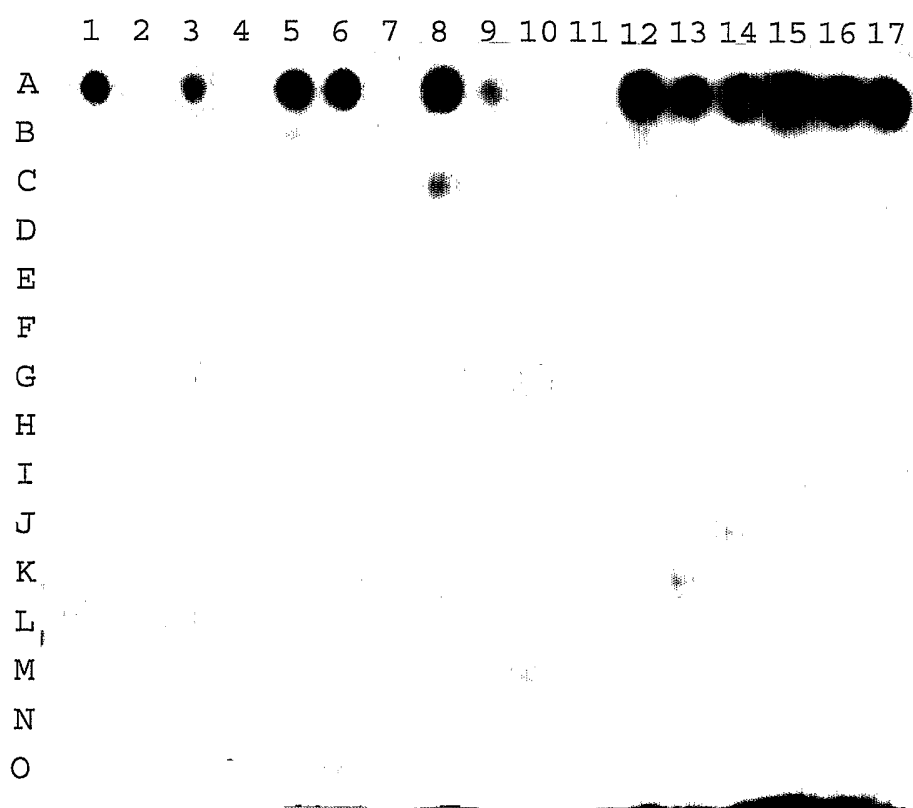


Abb. 5C, Block 3

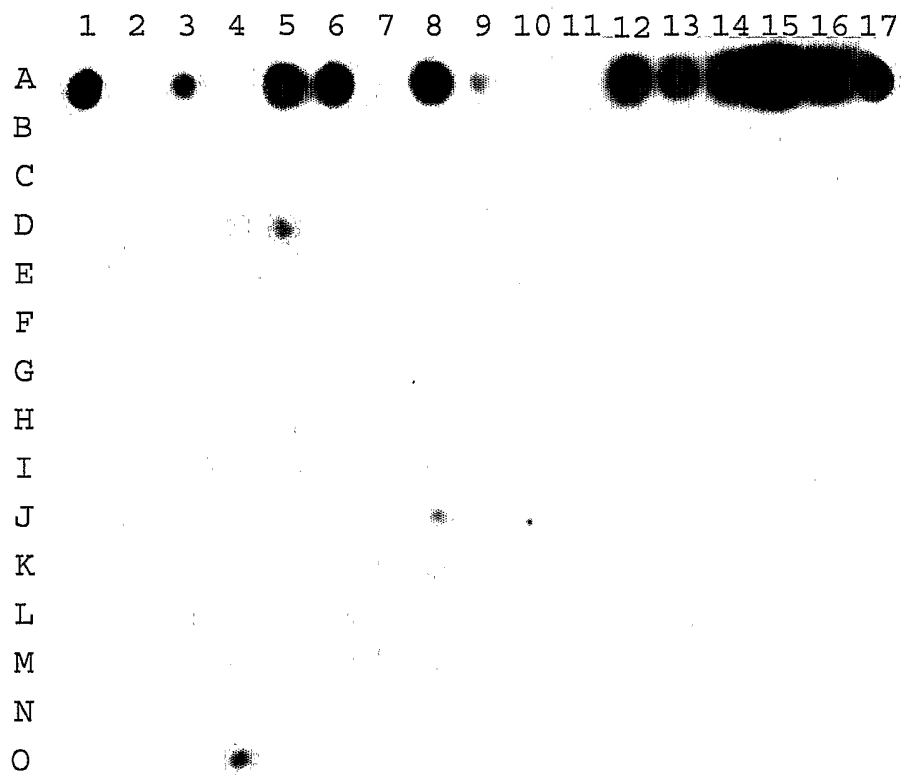


Abb. 5D, Block 4

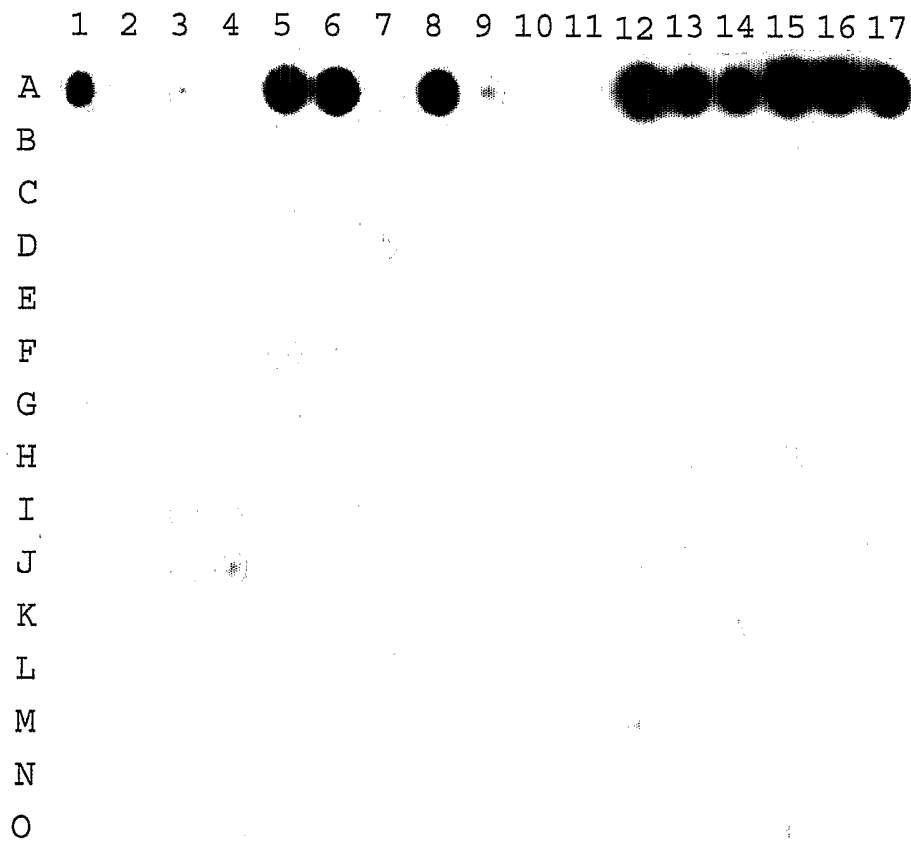


Abb. 5E, Block 5

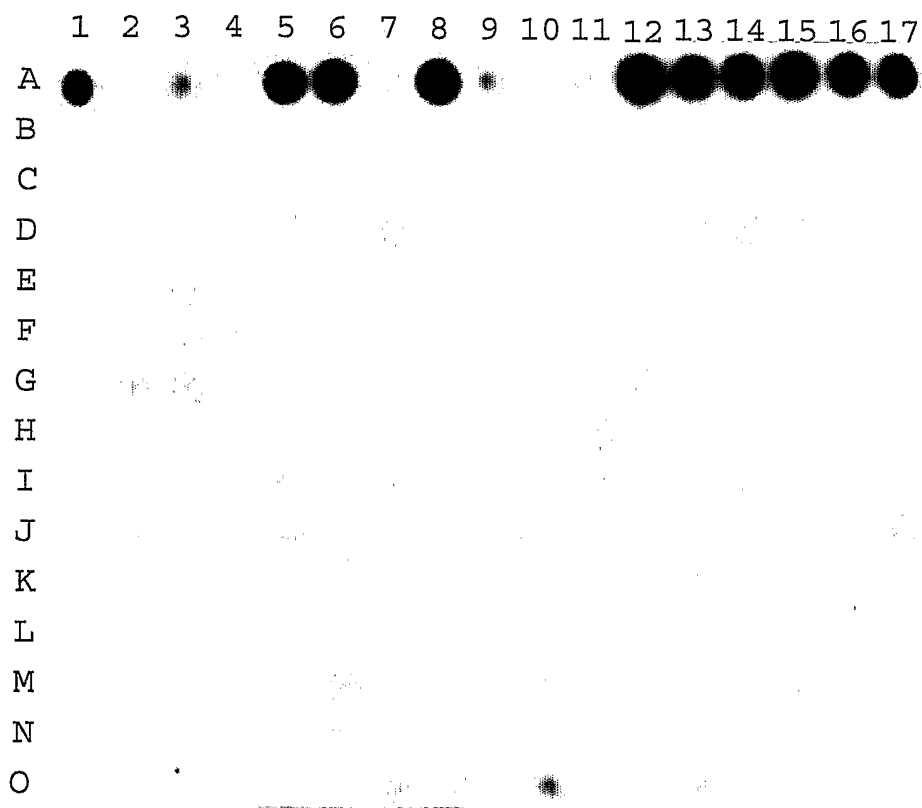


Abb. 5F, Block 6

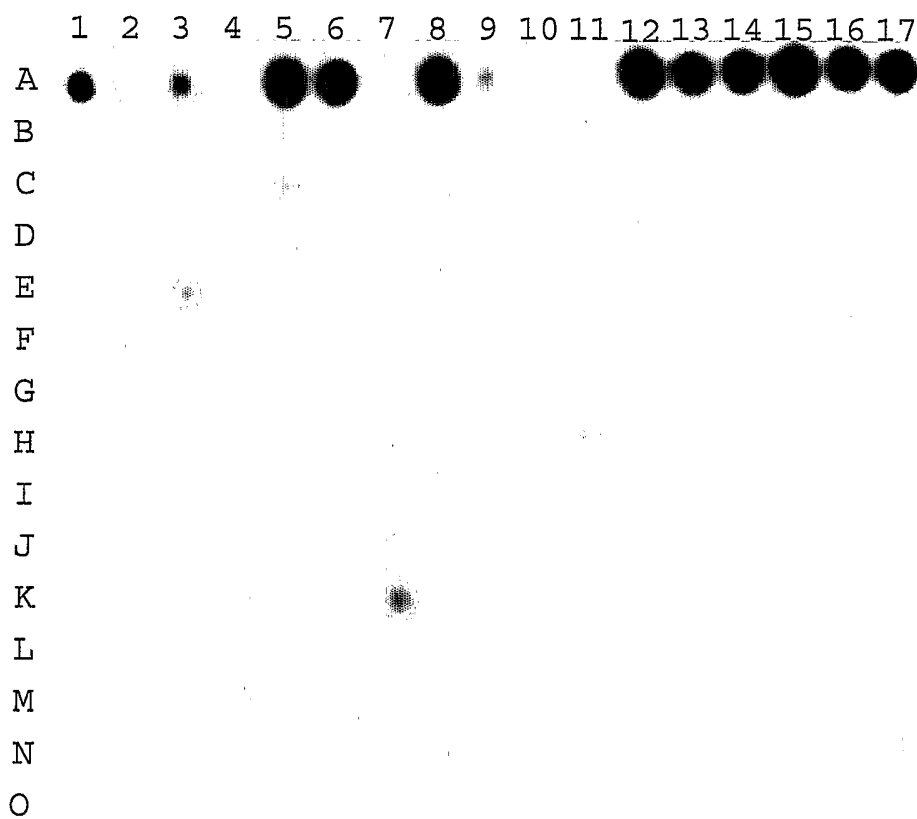


Abb. 6A

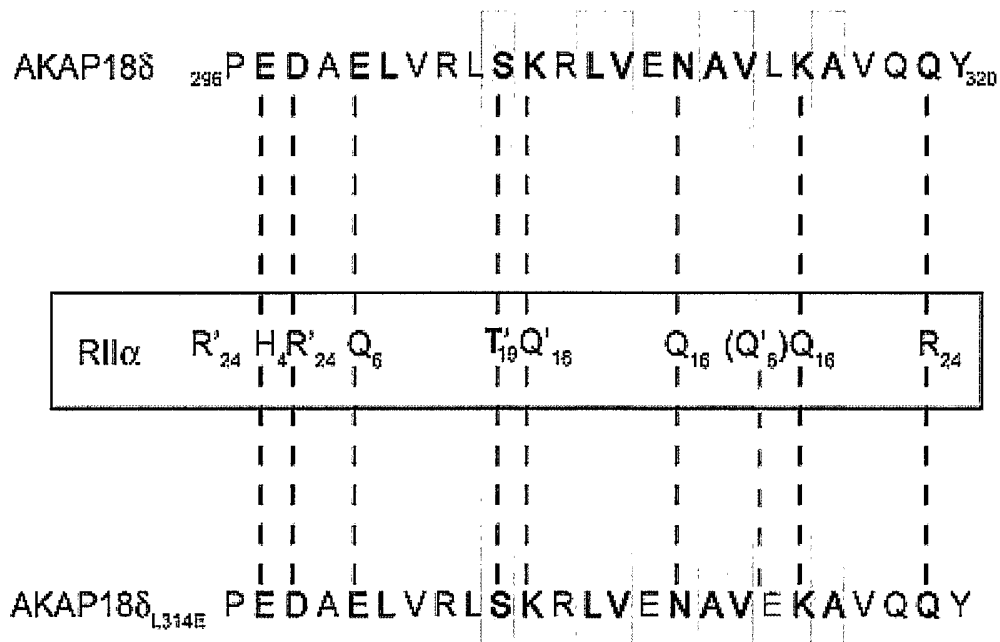


Abb. 6B

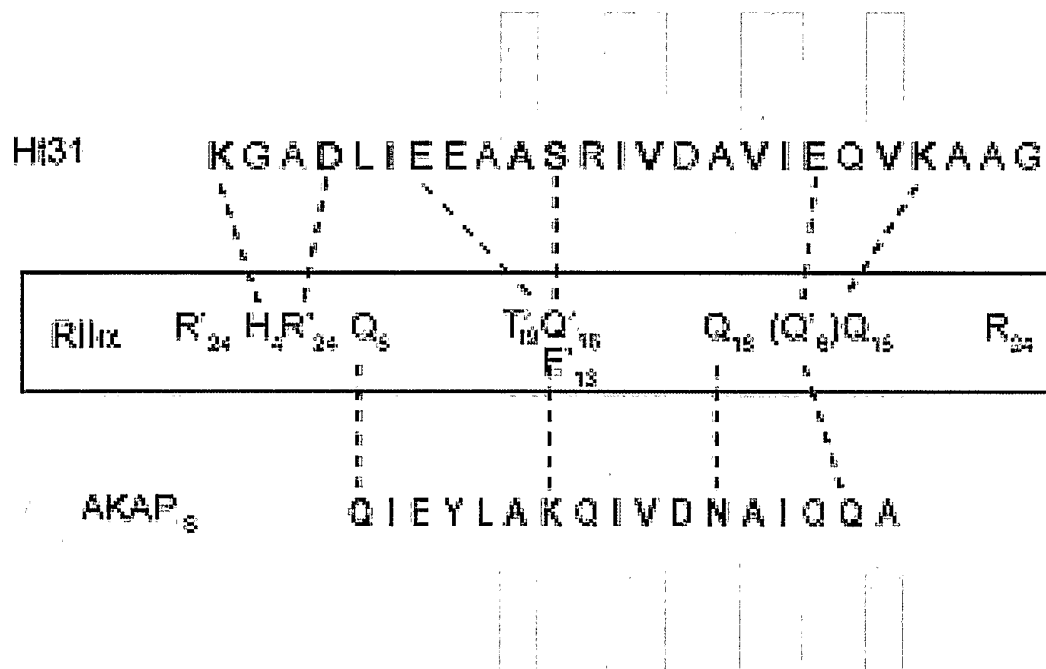


Abb. 6C

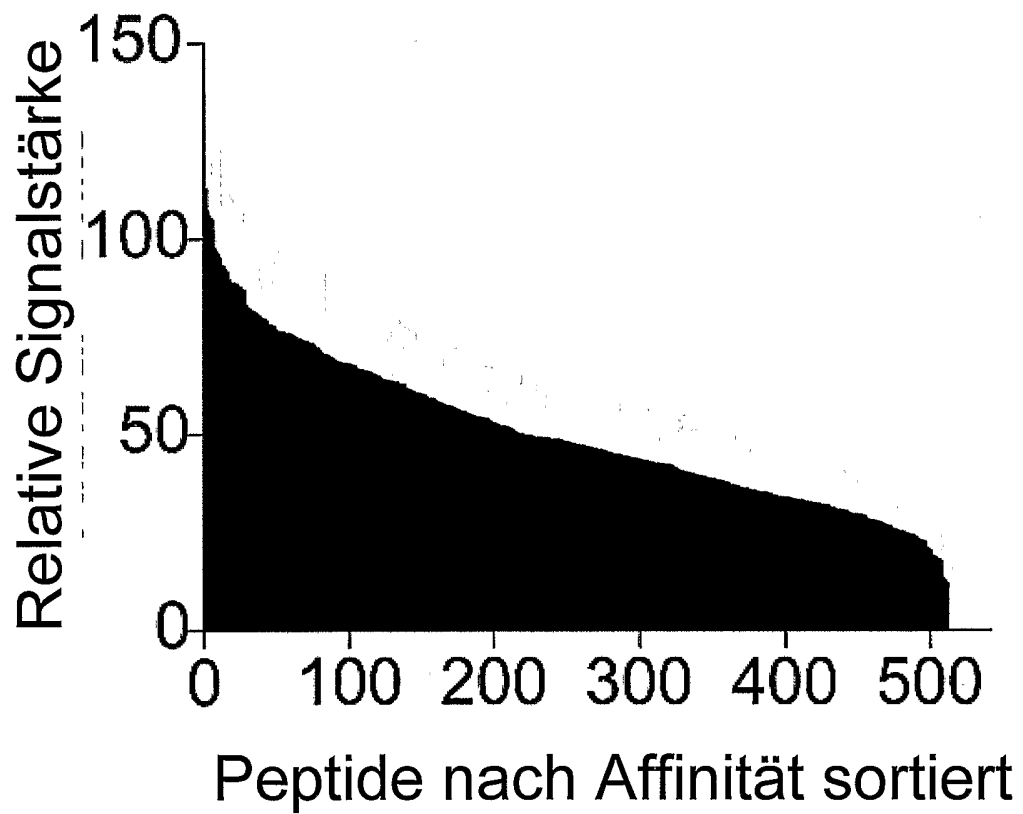


Abb. 6D

