

## 4. Summary and Conclusions (german)

*Native chemical ligation (NCL)* und die verwandte Technik *Expressed Protein Ligation (EPL)* haben sich in der Vergangenheit als äußerst nützlich für die Synthese von verschiedenen Proteinen erwiesen. Insbesondere das Konzept der *EPL* demonstriert auf elegante Weise die Nützlichkeit einer Kombination von Chemie und Biologie, um komplexe biochemische und physiologische Fragestellungen zu beantworten.

Das Ziel der vorliegende Arbeit war es, die *EPL* Methode für die Semisynthese von prenylierten Rab Proteinen zu entwickeln. Rab GTPasen haben eine Schlüsselfunktion bei der Kontrolle des intrazellulären vesikulären Transportes in eukaryotischen Zellen. Die posttranslationale Modifikation von zwei Cysteinen mit je einem hydrophoben Lipid (Prenylierung) im C-terminalen Bereich der Rab Proteine wird von der Geranylgeranyltransferase II (GGTase-II) katalysiert und ist essentiell, um den Rab Proteinen die Ausübung ihrer Funktionen zu ermöglichen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden kurze, geranylgeranylierte (C<sub>20</sub> isoprenoide Verbindung) Peptide mit Hilfe der *EPL* spezifisch C-terminal an verkürzte Rab Protein  $\alpha$ -Thioester gekuppelt. Bei diesen Studien wurden einige interessante (und bis dato nicht beschriebene) Aspekte dieser Reaktion beobachtet. Es konnte festgestellt werden, dass die erfolgreiche Synthese der lipidierten Peptid-Protein-Konjugate die Verwendung bestimmter Additive, insbesondere von Detergenzien, voraussetzte. Obwohl die Wirkungsweise der Detergenzien bei der Reaktion nicht eindeutig bestimmt werden konnte, lässt sich dennoch vermuten, dass sie als mizellare Katalysatoren fungieren. Diese Erkenntnisse könnten sich in Zukunft bei der Synthese von anderen (integralen) Membranproteinen als nützlich erweisen. Desweiteren konnte beobachtet werden, dass Rab Protein  $\alpha$ -Thioester zu Nebenreaktionen neigen, wenn es sich bei der C-terminal aktivierten Aminosäure um Asparagin oder Glutamin handelt. Diese Nebenreaktionen führen zur Zyklisierung der C-terminalen Aminosäure. Die entstandenen Imide konnten interessanterweise unter den typischen *EPL* Bedingungen mit prenylierten Peptiden umgesetzt werden.

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen auch die Einschränkungen einer Anwendung chemischer Methoden auf die Beantwortung biologischer Fragestellungen auf, insbesondere die Notwendigkeit in wässrigen Lösungsmittel zu arbeiten, um die Löslichkeit und den funktionalen Zustand biologischer

Makromoleküle zu erhalten. Obwohl die bemerkenswerte Lösungsmittelinkompatibilität der Rab Protein  $\alpha$ -Thioester und der untersuchten prenylierten Peptide gelöst werden konnte, so führten die angewandten Bedingungen dennoch zur Denaturierung der Proteine. Die Rückfaltung der lipidierten Rab Proteine konnte in dieser Studie zum ersten Mal erfolgreich durchgeführt werden. Die erhaltenen semisynthetischen Rab Proteine sind biologisch aktiv und konnten mit bekannten Interaktionspartnern komplexiert werden (z.B. mit RabGDI, REP-1, GGTase-II).

Das ausgearbeitete Verfahren erlaubte zum ersten Mal die Generierung von einfach prenylierten Rab Proteinen, die als Intermediate bei der GGTase-II katalysierten Prenylierungsreaktion kurzzeitig auftreten. Mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie und Fluoreszenzmarkern, die in die synthetischen Peptide eingebaut wurden, konnte die Wechselwirkung dieser Intermediate mit der GGTase-II detailliert studiert werden. Die erhaltenen Dissoziationskonstanten (die diese Interaktion beschreiben) konnten zeigen, dass die Intermediate sehr fest an die GGTase-II gebunden sind. Mit Hilfe der ebenfalls bestimmten Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation konnte darüberhinaus ein Modell entwickelt werden, nach dem eine Dissoziation der einfach prenylierten Intermediate im Verlauf der Rab Doppelprenylierungsreaktion nicht zwangsläufig stattfinden muss.

Die eingeführten Fluoreszenzmarker ermöglichten ferner die Zeit aufgelöste Beobachtung des enzymatischen Umsatzes der einfach prenylierten Intermediate zum doppelprenylierten Produkt. Die Daten lassen darauf schließen, dass die GGTase-II eine klare Präferenz für eines der zwei möglichen Reaktionsintermediate aufweist. Zumindest im Falle von Rab7 scheint demnach die Mehrheit der Proteine zuerst C-terminal prenyliert zu werden, gefolgt von der Modifizierung des intern lokalisierten Cysteins.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Generierung von prenylierten Rab Proteinen im Multimilligramm Maßstab für kristallografische Studien. Auch in diesem Fall wurden die semisynthetischen Rab Proteine an Interaktionspartner komplexiert. Sechs Komplexe konnten im präparativen Maßstab gewonnen werden, von denen zwei erfolgreich kristallisiert werden konnten. Die Strukturen der einfach und doppelt prenylierten Rab:RabGDI Komplexe wurden mit hoher Auflösung bestimmt und ermöglichten erstmals einen strukturellen Einblick in die Funktion von RabGDI.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das entwickelte EPL Verfahren ideal erscheint, um homogen prenylierte Rab Proteine in preparativer Menge zu erhalten.

Die ausgearbeiteten Protokolle sind leicht durchführbar und sollten die routinemäßige Produktion von unterschiedlich funktionalisierten Rab Proteinen ermöglichen. Die Nützlichkeit solcher Proteine konnte in dieser Arbeit mit Hilfe von biochemischen und biophysikalischen Studien demonstriert werden.