

Zusammenfassung der Dissertation

Der erste Teil der Dissertation widmet sich dem Studium von Struktur und Dynamik des C-Terminus des N-Ras-Proteins in Phospholipid-Membranen mittels Festkörper-NMR-Techniken. In dieser Arbeit wurden drei semi-synthetische N-Ras-Proteine konstruiert, bei denen die Palmitoylgruppe durch eine Hexadecyleinheit ersetzt wurde, um eine bessere Stabilität zu gewährleisten. Zur Verstärkung der NMR-Signale des Proteins und zur Unterdrückung der Signale der Lipidmatrix, wurden mit ^{13}C - und ^{15}N -Isotopen angereicherte C-terminale N-Ras Peptide dargestellt. Darüber hinaus wurde die Hexadecylkette des Peptids mit ^2H markiert, um Informationen über die Dynamik des Proteins in Wechselwirkung mit Phospholipid-Membranen zu erhalten. Im Sinne einer chemisch-biologischen Fragestellung wurden zunächst durch chemische Synthese isotopenmarkierte C-terminale Peptide dargestellt und diese dann biochemisch mit dem wasserlöslichen N-Ras Protein über eine MIC-Ligation verknüpft. Die hierbei erzielte moderate Ausbeute war ausreichend, um die folgenden NMR-Studien durchzuführen.

Um die chemischen Verschiebungen von $^{13}\text{C}\alpha$, $^{13}\text{C}\beta$, ^{13}CO und $^1\text{H}\alpha$ des C-Terminus von membran-gebundenen N-Ras zuzuordnen, wurden mittels direkt angeregte ^{13}C -NMR Experiment, ^{13}C -Kreuzpolarisationsexperimente, ^{13}C - ^{13}C - und ^{13}C - ^1H Korrelations-experimente durchgeführt. Aus diesen Daten konnten mithilfe des TALOS-Programmpakets empirische Voraussagen der Phi (Φ)- und Psi (Ψ)-Rückgratstruktur der membranbindenden Domäne von N-Ras gemacht werden.

Auf den TALOS-Voraussagen über den Torsionswinkel basierend, wurde ein Strukturmodell des membran-gebundenen lipidierten Ras-Proteins berechnet. Der C-Terminus des membrangebundenen Ras Proteins ähnelt in seiner Struktur einem Hufeisen. Der Membrananker von Ras verfügt nicht über reguläre α -helikale oder β -Faltblatt-Motive. Die Membrantopologie des Proteins ist bestimmt durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem lipidierten Cystein und hydrophoben Seitenketten. Die lipidbindende Domäne ist mit der GTP-bindenden N-terminalen Region des Proteins über eine Linker-Domäne verknüpft, die mutmaßlich flexibel ist. Im Gegensatz zu H-Ras existiert gegenwärtig noch keine Struktur des N-Terminus von N-Ras. Dennoch kann bei einer Sequenzhomologität von 92 % von einer hohen strukturellen Ähnlichkeit ausgegangen werden.

Eine deuteriummarkierte Hexadecyl-Lipidkette an Cystein 181 von N-Ras wurde zur Gewinnung dynamischer Informationen über die Wechselwirkung von N-Ras-Lipidkette und Phospholipid-Membran eingesetzt. Aus ^2H -NMR-Experimenten berechnete Ergebnisse zur Dynamik deuten darauf hin, dass sich die Kette in die Hostmembran einbaut, wobei die Konfigurationsentropie größtenteils erhalten bleibt und die Lipidmembran relativ unverändert bleibt. Die dynamischen Eigenschaften dieser Lipidkette unterscheiden sich jedoch vollständig von denen einer Phospholipid-Membran, da ein niedriger Ordnungsparameter und eine hohe Bewegungsamplitude innerhalb der Phospholipid-Membran berechnet wurden.

Die molekulare Dynamik von Rückgrat und Seitenketten der sieben isotopen-markierten C-terminalen Aminosäuren von Ras wurden mittels ^{13}C -MAS-NMR untersucht. Hierbei wurde durch 2D DIPSHIFT-Experimente der Ordnungsparameter von Rückgrat und Seitenkette bestimmt. Für den Ordnungsparameter von farnesyliertem Cystein 181 wurde ein um etwa 60 % höher Wert als für hexadecyliertes Cystein 186 gefunden, was für eine relative hohe Rigidität der Farnesylmodifikation von Cystein 186 spricht. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der C-Terminus von membranassoziiertem Ras-Protein eine vielseitige Dynamik aufweist.

Die zweite Hälfte dieser Dissertation setzt sich mit der Identifikation von Peptidinhibitoren der Rab GGTase, einem Enzym der Rab-Proteine, auseinander. Als Leitstruktur für die Peptidinhibitoren dient der Naturstoff Pepticinnamin E. Es wurde gezeigt, dass die Festphasensynthese einer Peptidbibliothek unter Anwendung des Hydrazidlinkers eine effiziente Methode zur Herstellung einer großen Zahl von Substanzen in kurzer Zeit ermöglicht. Durch Nutzung dieses „spurlosen“ Linkers wurden etwa 380 Pepticinnamin-Derivate dargestellt. Zur Abspaltung der Peptide von der festen Phase wurden zwei Oxidationsmethoden angewandt, die zu unterschiedlichen Derivaten am C-Terminus der Peptide führten: NBS/Pyridin und $\text{Cu}(\text{OAc})_2$.

Bei 18 dieser 382 Peptidinhibitoren wurde eine inhibitorische Aktivität bei der Rab GGTase gefunden; in der Folge wurden IC_{50} -Werte zwischen $1\ \mu\text{M}$ und $70\ \mu\text{M}$ für diese Peptide bestimmt. Eine Analyse der Struktur-Aktivitäts-Beziehung ergab, dass Peptide mit langer Lipidkette am N-Terminus und Metall-chelatisierenden Eigenschaften am C-Terminus die höchste inhibitorische Aktivität bei Rab GGTase aufweisen. So wurde für die Verbindung **81**,

die diese beiden strukturellen Bedingungen erfüllt, ein IC_{50} -Wert von etwa $1 \mu\text{M}$ gegen das Enzym bestimmt.

Drei Verbindungen, **59**, **80** und **81**, zeigten *in vivo* – Aktivität gegen Rab GGTase in der Zelle. In einem Selektivitäts-Screening zeigten diese Peptide eine hohe inhibitorische Selektivität gegen Rab GGTase im Vergleich zu FTase und GGTase I. Kinetische Untersuchungen mit **81** zeigen eine in Bezug auf das Lipidsubstrat nicht-kompetitive Inhibierung der Rab GGTase mit einem K_D -Wert von etwa 600 nM .