

Synthese und Evaluierung stabilisierter Bindungsepitope zur Adressierung kleiner GTPasen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
der Fakultät für Chemie und Chemische Biologie
der Technischen Universität Dortmund

DISSERTATION

von

M. Sc. Jochen Spiegel

geboren in Rothenburg ob der Tauber

Bei dieser Veröffentlichung handelt es sich um eine Dissertation der Fakultät Chemie und Chemische Biologie an der Technischen Universität Dortmund.

Die vorliegende Dissertation entstand im Zeitraum von September 2011 bis Dezember 2015 unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. h.c. Herbert Waldmann an der Fakultät für Chemie und Chemische Biologie der Technischen Universität Dortmund und dem Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund.

Dekanin: Prof. Dr. Insa Melle

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. Herbert Waldmann

2. Gutachter: Prof. Dr. Tom N. Großmann

Eingereicht am 05.01.2016

Tag der mündlichen Prüfung: 04.03.2016

Für meine Familie

Die folgenden Publikationen resultierten aus Teilen dieser Doktorarbeit

- Cromm PM, Spiegel J, Grossmann TN, Waldmann H "Direct modulation of GTPase activity and function". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2015**, *54*, 13516-37; *Angew. Chem.*, **2015**, *127*, 13718-13741.
- Cromm PM, Spiegel J, Grossmann TN "Hydrocarbon stapled peptides as modulators of biological function". *ACS Chem. Biol.*, **2015**, *10*, 1362-1375.
- Spiegel J, Cromm PM, Zimmermann G, Grossmann TN, Waldmann H "Small molecule modulation of Ras". *Nat. Chem. Biol.*, **2014**, *10*, 613-622.
- Spiegel J, Cromm PM, Itzen A, Goody RS, Grossmann TN, Waldmann H "Direct targeting of Rab-GTPase-effector interactions". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2014**, *53*, 2498-2503.; *Angew. Chem.*, **2014**, *126*, 2531-2536.

Die folgenden Konferenzbeiträge resultierten aus Teilen dieser Doktorarbeit

- Spiegel J, Cromm PM, Itzen A, Goody RS, Grossmann TN, Waldmann H. "Stabilized Peptides Targeting Protein-Protein Interactions of small GTPases" (Vortrag), 4th Symposium of the RIKEN-Max Planck Joint Research Center for Systems Chemical Biology, (Kobe, Japan), **2015**.
- Spiegel J, Cromm PM, Itzen A, Goody RS, Grossmann TN, Waldmann H. "Hydrocarbon stapled peptides targeting protein-protein interactions of small GTPases" (Posterbeitrag), 3rd Annual Conference of the International Chemical Biology Society, (San Francisco, CA, USA), **2014**.
- Spiegel J, Cromm PM, Itzen A, Goody RS, Grossmann TN, Waldmann H. "Inhibition of Rab GTPase protein-protein interactions via hydrocarbon stapled peptides" (Posterbeitrag), EMBO Conference Series – Chemical Biology, (Heidelberg, Germany), **2014**.
- Spiegel J, Cromm PM, Itzen A, Goody RS, Grossmann TN, Waldmann H. "Direct Targeting of Rab-GTPase Effector Interactions" (Poster), Marktplatz bio.dortmund, (Dortmund, Germany), **2013**.
- Spiegel J, Cromm PM, Itzen A, Goody RS, Grossmann TN, Waldmann H. "Hydrocarbon stapled peptides targeting of Rab-Protein-Protein Interactions" (Vortrag), Sci-X-Talks (Amsterdam, Netherlands), **2013**.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Modulation von Protein–Protein-Interaktionen mittels stabilisierter Bindungsepitope	2
2.1	Adressierung von Protein–Protein-Interaktionen	2
2.2	Peptidmimetika von β -Strängen	5
2.3	Peptidmimetika von α -Helices	8
2.4	α -Methylierte, kohlenwasserstoffverbrückte Peptide	10
3	Die Superfamilie kleiner GTPasen	15
3.1	Die Ras-Familie	17
3.2	Die Rab-Familie	20
3.3	Modulierung der Signalwirkung kleiner GTPasen	22
4	Zielsetzung der Arbeit	29
5	Ergebnisse und Diskussion	31
5.1	Synthese α -helikal stabilisierter Peptide	31
5.2	Adressierung der Ras-Aktivität mittels stabilisierter Peptid-Sekundärstrukturen	35
5.3	Modulation der Rab-Aktivität mittels stabilisierter Peptid-Sekundärstrukturen	56
5.4	Optimierung eines α -helikalen Rab8-Effektor-Inhibitors	76
6	Zusammenfassung	82
7	Experimentalteil	85
7.1	Material und Geräte chemischer Experimente	85
7.2	Bausteinsynthese	88
7.3	Peptidsynthese	95
7.4	Material und Geräte biologischer Experimente	114
7.5	Biochemische und biophysikalische Methoden	118
8	Abkürzungsverzeichnis	125
9	Literatur	129
10	Anhang	153

Danksagung

Meinem Doktorvater Professor Dr. Dr. h.c. Herbert Waldmann möchte ich herzlich für die interessante Themenstellung und seine stete Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit danken. Zudem möchte ich mich für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen und die große wissenschaftliche Freiheit bedanken, die er mir zugestanden hat.

Herrn Professor Dr. Tom Großmann möchte ich ganz herzlich für zahlreiche Denkanstöße und hilfreiche Erklärungen, seine stete Bereitschaft zu wissenschaftlichen Diskussionen und die hervorragende Betreuung danken. Zudem bin ich ihm für die Übernahme des Zweitgutachtens sehr dankbar.

Professor Dr. Aymelt Itzen und Professor Dr. Roger Goody danke ich für die gute Zusammenarbeit und hilfreiche Denkanstöße. Mein besonderer Dank gebührt Herrn Philipp Cromm für unsere gute Zusammenarbeit über die gesamte Promotion hinweg, die vielen tiefgreifenden wissenschaftlichen und nicht wissenschaftlichen Diskussionen, seine Geduld und die fantastische Laboratmosphäre. Den Mitarbeitern des Waldmannschen und des Großmannschen Arbeitskreises, bin ich für ihre Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit äußerst dankbar. Besonders danke ich dabei meinen vormaligen und aktuellen Bürokollegen für die angenehme Arbeitsatmosphäre in unserem Büro. Meinen Bachelorstudenten Julia Kriegesmann und Mathias Wendt bin ich für ihre hohe Motivation, ihr großes Interesse und gute Arbeit als wissenschaftlichen Hilfskräfte sehr verbunden. Frau Nathalie Bleimling und Frau Christine Nowak danke ich für ihre Hilfe bei der Expression zahlreicher kleiner GTPasen, ihre Geduld und hilfreichen Erklärungen. Ebenso danke ich den Mitarbeitern der Dortmund Protein Facility für ihre Unterstützung bei verschiedenen Klonierungs- und Expressionsprojekten. Frau Dr. Petra Janning und Herrn Jens Warmers danke ich für ihre Hilfe bei HPLC- und Massenspektrometrie. Herrn Philipp Kückler danke ich für Rat und Tat bei biochemischen und zellbiologischen Problemen. Frau Melanie Schwalfenberg bin ich für die Bereitstellung von HCT116 Zellen sehr dankbar. Herrn Dr. Emmerich Mihai Gazdag danke ich für Hilfe bei der Proteinkristallisation.

Für die Aufheiterung trister Labortage und viele gemeinsame Unternehmungen außerhalb des Instituts möchte ich Philipp Cromm, Adrian Glas, Philipp Kückler, Melanie

Schwalfenberg, Kirsten Tschapalda, Peter Schröder, Gunther Zimmermann, Vincent Eschenbrenner-Lux und Guillaume Garivet ganz herzlich danken. Herrn Stefan und Christoph Bernhard, Mathias Probst, Sebastian Schmidt, Martin Hornung, Joachim Zimmer, Steffen Holzinger, Volker Raffelsbauer, Benjamin Breitschwert, Linus Stegbauer, Mäx Blauth, Johannes Schlüter danke ich für die langjährige Freundschaft, die uns verbindet.

Herrn Dr. Udo Niederreuther danke ich ganz herzlich dafür, dass er mein Interesse für Chemie geweckt hat. Ebenso bin ich Herrn Prof. Kessler für seine Unterstützung während meines Chemiestudiums sehr dankbar.

Den Fonds der Chemischen Industrie danke ich für die Förderung im Rahmen eines Kekulé-Stipendiums und der Max Planck-Gesellschaft für die Unterstützung im Rahmen eines Doktoranden-Stipendiums.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich seit jeher uneingeschränkt unterstützt und mir insbesondere während meines Studiums und meiner Promotion viel Geduld und Verständnis entgegengebracht hat.

Kurzzusammenfassung

Kleine GTPasen dienen als molekulare Schalter bei der Kontrolle zahlreicher wichtiger zellulärer Prozesse. Die fehlerhafte Funktion kleiner GTPasen steht daher in Verbindung mit der Entstehung und Entwicklung diverser Erkrankungen. Allerdings konnte diese Proteinklasse mit konventionellen Methoden nur äußerst schwer direkt adressiert werden, da ihre Regulierung und biologische Signalwirkung über ausgedehnte und flache Protein-Protein-Interaktionen (PPIs) vermittelt werden. Um Verbindungen zu generieren, die an kleine GTPasen binden und potentiell ihre Signalwirkung modulieren können, wurden deshalb im Rahmen dieser Arbeit Bindungsepitope natürlicher Interaktionspartner konformativ stabilisiert. Auf Basis struktureller Daten von GTPase-Protein-Komplexen wurden dazu geeignete Peptidsequenzen identifiziert und chemisch modifiziert.

Im ersten Teil der Arbeit wurden Ras-Proteine, die prominenteste Unterfamilie kleiner GTPasen, adressiert. Basierend auf einem α -helikalen Bindungsmotiv des Nukleotidaustauschfaktors SOS wurden Peptide mit α -methylierter Kohlenwasserstoffverbrückung (*hydrocarbon stapled peptides*) entwickelt, während eine vom Effektor c-Raf abgeleitete β -Haarnadel mittels unterschiedlicher Verbrückungsstrategien stabilisiert wurde. Aufgrund der sehr geringen Affinität der Ausgangssequenzen wurden jedoch keine Derivate erhalten, die für eine Anwendung als PPI-Inhibitoren geeignet wären.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde in einer breit angelegten Machbarkeitsstudie eine analoge Strategie für die größte Unterfamilie kleiner GTPasen, sog. Rab-Proteine, verfolgt. Ausgehend von diversen α -helikalen Bindungsmotiven wurde eine Bibliothek von *stapled peptides* generiert, die sich im Vergleich zu den Ausgangssequenzen durch deutlich gesteigerte Affinitäten auszeichneten. Obgleich die Peptide keinen Einfluss auf die GEF-vermittelte Nukleotidaustauschrates von Rab-GTPasen zeigten, konnte ein Peptid identifiziert werden, das selektiv an die aktivierte Form von Rab8a bindet und in der Lage ist, eine Rab-Effektor-Wechselwirkung *in vitro* zu inhibieren. Abschließend konnte durch Variation der Verbrückungsarchitektur die Affinität dieses Peptids weiter gesteigert werden.

Abstract

Small GTPases work as molecular switches inside cells and play a key role in the control of numerous crucial cellular processes. The aberrant function of small GTPases has therefore been associated with a variety of different diseases. However, the direct targeting of small GTPases by means of conventional small molecular approaches has turned out to be extremely challenging as GTPase regulation and signaling is mediated by shallow and extended protein–protein-interaction surfaces. In this thesis stabilized peptide binding epitopes derived from protein interaction sites of natural interaction partners were explored as modulators of GTPase signaling. Based on structural data of GTPase–protein complexes suitable peptide sequences were selected and chemically modified.

The first part of this thesis explored this strategy for Ras proteins, the most prominent subfamily of small GTPases. Based on an α -helix of the nucleotide exchange factor SOS a small library of hydrocarbon stapled peptides was generated, while a c-Raf derived β -hairpin was stabilized using different types of cross-links. However, none of the peptide derivative showed sufficient target affinity, probably due to very poor affinities of the corresponding wild type sequences.

In the second part of the thesis the same approach was applied to Rab proteins, the largest subfamily of small GTPases. A library of hydrocarbon stapled peptides was designed based on a variety α -helical binding epitopes from different Rab interaction partners. These peptides showed significantly increased affinities. Though no influence on the GEF-catalyzed nucleotide exchange was observed, one of the stapled peptides binds selectively to activated Rab8a and inhibits a Rab8a–effector-interaction *in vitro*. Target affinity was further improved by variation of the stapling architecture.

1 Einleitung

Im Laufe der letzten Jahrzehnte führten intensive Forschungsbemühungen zu einem immer genaueren mechanistischen Verständnis für die Entstehung und Entwicklung menschlicher Krebserkrankungen. Enorme Fortschritte auf den Gebieten der Genomik und Proteomik erlaubten die Identifizierung einer Vielzahl von Protoonkogenen, deren Mutation in Zellen den Übergang von normal reguliertem Wachstumsverhalten zu ungebremstem Tumorwachstum verursacht, die Entwicklung maßgeschneiderter Therapiemethoden ermöglichen kann.¹ Es existieren jedoch noch etliche Onkoproteine, die durch biologische Studien als Mitverursacher menschlicher Krebserkrankungen validiert wurden, für die jedoch bisher keine wirksame Behandlungsstrategie entwickelt wurde. Diese aus mechanistischer Sicht oftmals hochattraktiven Zielproteine, zeichnen sich zumeist durch bestimmte Charakteristika, wie z.B. einen Mangel an wohldefinierten Bindetaschen aus, die sie mit klassischen medizinalchemischen Methoden als nicht adressierbar („undruggable“) erscheinen lassen.^{2,3} Ein Paradebeispiel für einen derartigen Fall liefert die Ras-Superfamilie kleiner GTPasen. Die *Ras (rat sarcoma)*-Gene zählen mit einer Prävalenz von 20–30 % zu den am häufigsten mutierten Onkogenen menschlicher Krebserkrankungen,⁴ aber auch andere Unterfamilien kleiner GTPasen wurden zunehmend mit der Entwicklung verschiedener menschlicher Erkrankung in Verbindung gebracht.⁵ Ein Großteil der Signalwirkung und Regulation kleiner GTPasen wird durch Protein–Protein-Interaktionen (PPIs) von ausgedehnten und flachen Wechselwirkungsflächen vermittelt, die mit klassischen Methoden nur äußerst schwer zu modulieren sind. Obwohl die Rolle von *Ras* bei der Entstehung menschlicher Krebserkrankungen vor nunmehr 50 Jahren entdeckt wurde, bestehen noch immer keine geeigneten Methoden, um Vertreter dieser Proteinklasse wirksam direkt zu adressieren.⁶

2 Modulation von Protein–Protein-Interaktionen mittels stabilisierter Bindungsepitope

2.1 Adressierung von Protein–Protein-Interaktionen

Protein–Protein-Interaktionen beruhen auf den nicht-kovalenten Wechselwirkungen oberflächennaher Proteindomänen zweier oder mehrerer Proteine.⁷ Sie sind seit langem als ein wesentliches Element zellulärer Regulations- und Signaltransduktionsvorgänge bekannt und stellen attraktive Ansatzpunkte für die Entwicklung von Medikamenten und biologischen Werkzeugen dar. Die Assoziation und Dissoziation funktionaler Proteinkomplexe ist ein dynamischer Prozess, der in großen und komplexen Netzwerken organisiert ist. Diese Wechselwirkungen werden zumeist durch dynamische und vergleichsweise gering profilierte Proteinoberflächen vermittelt,⁸ die typischerweise eine Ausdehnung von ca. 1000 - 3000 Å² haben.⁹ Eine computergestützte Untersuchung von mehr als 35 000 Proteinkomplexen der Protein Datenbank ergab, dass meist mehrere dutzend Reste in die Interaktionen involviert sind, die oft in unverbundenen Segmenten organisiert sind.¹⁰ In vielen Fällen existieren allerdings einige wenige Aminosäuren, die den Hauptanteil der Gibbs-Energie der Wechselwirkung beitragen, sog. *hot spots*.¹¹ Klassische niedermolekulare Wirkstoffe (ca. 300 - 500 Å²)⁹ binden allerdings häufig in wohldefinierte, konkave Taschen und bieten keine ausreichende Molekülgröße, um wirksam mit natürlichen Bindungspartnern in Konkurrenz zu treten.¹² Daher galten PPIs für lange Zeit als pharmakologisch unzugänglich („*undruggable*“).¹³ Ein besseres Verständnis der PPIs durch biophysikalische und biochemische Methoden, Fortschritte im Bereich struktur- und computerbasierter Analysentechniken und das Erschließen eines geeigneten chemischen Raums führten zunehmend zu vielversprechenden Ergebnissen. So wurden bereits einige potente Moleküle entwickelt, die durch die Bindung der Oberfläche eines Proteins die Anlagerung natürlicher Wechselwirkungspartner verhindern können.^{7,14} Für die Adressierung komplexer PPIs haben sich zwischenzeitlich eine Reihe komplementärer Herangehensweisen mit jeweils eigenen Vor- und Nachteilen etabliert.¹⁵ Durch das Screening geeigneter Molekülbibliotheken im Hochdurchsatzverfahren können Moleküle identifiziert werden, die in transiente Bindungstaschen der Zielproteine binden oder die Proteinoberfläche allosterisch modulieren.¹⁶ Fragment-basierte Methoden identifizieren mit Hilfe struktur- oder computergestützter Analysen niedrigmolekulare Liganden von anfänglich geringer Affinität, die anschließend miteinander verbunden und

sukzessive in Richtung geeigneter Oberflächenmerkmale erweitert werden, um größere, hochaffine Moleküle zu generieren.^{17,18} Dadurch wurden im Verlauf der letzten zehn Jahre beeindruckende Erfolge erzielt. So wurden zwischenzeitlich mehr als 40 verschiedene PPIs adressiert, wobei mehrere Inhibitoren die klinische Testphase erreicht haben.¹⁹

Allerdings weisen PPI-Grenzflächen unterschiedlich große Ausdehnungen und Affinitäten auf (Abbildung 1). Am leichtesten zu adressieren sind Proteinoberflächen, bei denen die Assoziation über eine kurze peptidische Primärsequenz des Bindungspartners und einige wenige darin enthaltene Schlüsselaminosäuren vermittelt wird. Ein höheres Maß an Komplexität bieten isolierte Regionen, deren Wechselwirkung von einem Sekundärstrukturelement und der damit verbundenen definierten räumlichen Orientierung der Aminosäureseitenketten bestimmt wird. Die größte Herausforderung stellen ausgedehnte Proteinoberflächen dar, bei denen die Bindung über mehrere Regionen der Polypeptidsequenz vermittelt wird.¹⁹

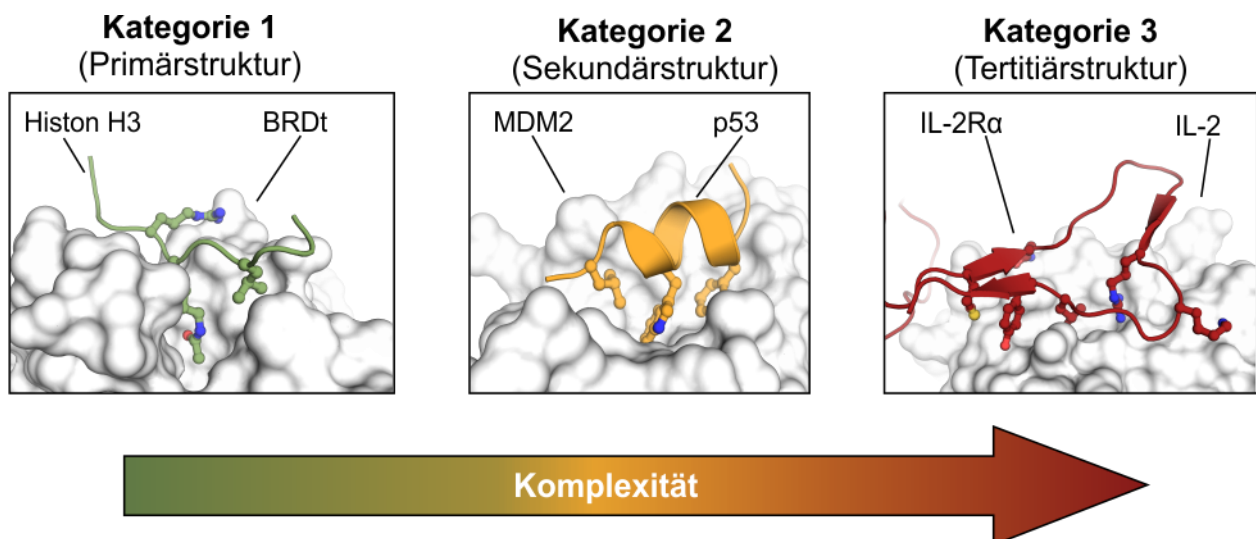


Abbildung 1. Die Ausdehnung, Affinität und Komplexität von PPI-Wechselwirkungsflächen bedingen deren Adressierbarkeit. PPIs lassen sich danach einteilen, ob das Bindungsepitop aus einer linearen Polypeptidsequenz (grün, PDB. 2WP1), einer einzelnen Sekundärstruktur (orange, PDB. 1YCR) oder verschiedenen Sequenzabschnitten bestehen, die eine definierte Tertiärstruktur (rot, PDB. 1Z92) erfordern. Die steigende Größe der Interaktionsfläche erschwert die direkte Adressierung durch synthetische Verbindungen.¹⁹ Für die verschiedenen Kategorien sind jeweils Kristallstrukturen von Beispielen gezeigt, mit Bindungsepitopen in der Cartoon-Darstellung und interagierenden Aminosäureseitenketten in expliziter Darstellung.

Dabei adressieren die bisher genannten Methoden zumeist PPIs der 1. Kategorie und stoßen in komplexeren Fällen bisher meist an ihre Grenzen.²⁰ Eine vielversprechende Strategie für die Adressierung ausgedehnter Proteinoberflächen besteht in der Nachahmung von Bindungsepitopen, die den wesentlichen Anteil zur Assoziation der Proteine beitragen.²¹ Dieser Ansatz macht sich die Strukturinformationen des Proteinkomplexes zunutze und resultiert in

Molekülen, die die bioaktive Konformation der Ausgangsproteine abbilden können.^{14,21–23} Isoliert man Peptidsequenzen aus der stabilisierenden Tertiärstruktur des Ausgangsproteins verlieren sie jedoch ihren hohen Ordnungsgrad und weisen in freier Lösung zumeist sehr flexible Konformationen auf (Abbildung 2).^{24,25}

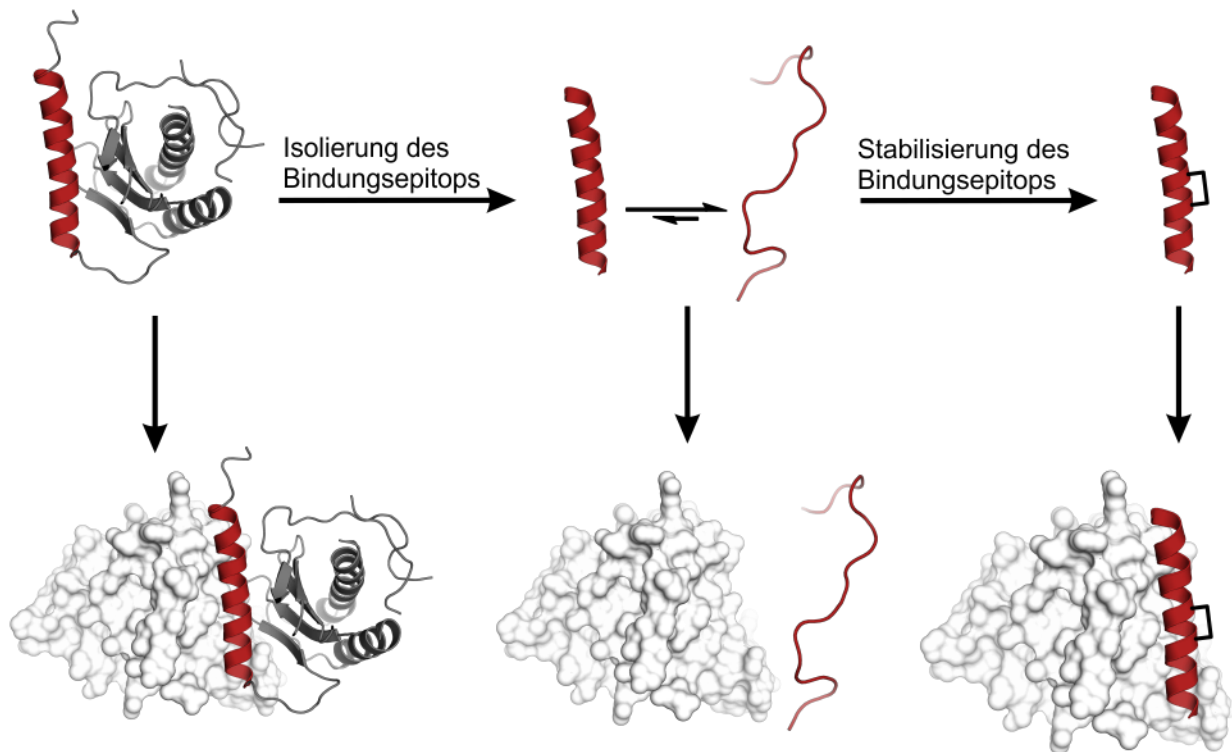


Abbildung 2. Stabilisierte Bindungsepitope als PPI-Modulatoren. Ein Großteil der Bindungsenergie wird bei PPIs von einzelnen Bindungsepitopen vermittelt. Werden diese Peptidsequenzen aus der stabilisierenden Tertiärstruktur isoliert, verlieren sie in Lösung oftmals ihre geordnete Struktur. Durch chemische Modifikationen kann die bioaktive Konformation stabilisiert werden.

Dies beeinträchtigt einerseits die Affinität der Peptide, da für die Bindung des Zielproteins erst wieder die definierte bioaktive Konformation eingenommen werden muss, was mit entropischen Verlusten einhergeht. Andererseits weisen flexible Peptidsequenzen oftmals eine erhöhte Anfälligkeit für proteolytischen Abbau und eine geringe Tendenz zu Zellgängigkeit auf.²⁶ Um diese Nachteile zu überwinden, wurden verschiedene Arten von chemischen Modifikationen und Gerüststrukturen entwickelt, welche die Bindungseigenschaften des Peptidvorläufers stabilisieren bzw. nachahmen. Derartige Peptidmimetika wurden historisch anhand ihrer chemischen Modifikation und ihres Substitutionsgrads klassifiziert.²² In der neusten Form der Einteilung werden Peptidmimetika entsprechend ihrer Ähnlichkeit mit dem natürlichen Vorläuferpeptid in vier verschiedene Klassen unterschieden: Peptide der Klasse A bestehen überwiegend aus α -Aminosäuren mit wenigen Seitenketten- oder Rückgratmodifikationen, während Peptide der

Klasse B zahlreiche Seitenketten- oder Rückgratmodifikationen wie auch Foldamere enthalten. In den Klassen C und D ist dagegen das Peptidrückgrat vollständig ersetzt, wobei Strukturmimetika der Klasse C die Seitenkettentopographie des Peptidvorläufer nachahmen. Mimetika der Klasse D haben dagegen keine direkte Verbindung zum Ursprungspeptid mehr, sondern ahmen nur noch dessen Funktion nach.²¹ Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag dabei auf Vertretern der Klasse A, die sich am direktesten aus Bindungsepitopen entsprechender Interaktionspartner ableiten lassen. Obwohl die konformative Stabilisierung von Kehlenstrukturen prinzipiell einen interessanten Ausgangspunkt darstellt,²⁷ wurden in bisherigen Studien im Wesentlichen α -Helices und wenige β -Faltblätter für die Generierung von PPI-Inhibitoren genutzt,²¹ sodass die wesentlichen Aspekte dieser Strategie im Folgenden eingehend diskutiert werden.

2.2 Peptidmimetika von β -Strängen

Beim Sekundärstrukturelement der β -Stränge ist die Polypeptidkette ziehharmonikaartig angeordnet, sodass die Seitenketten abwechselnd über oder unter das Rückgrat weisen. Die Stabilisierung erfolgt durch Wasserstoff-Brücken zwischen den Carboxyamid-Gruppen des Peptidrückgrats, die anders als bei der Helix nicht innerhalb eines Stranges, sondern zwischen zwei benachbarten Strängen ausgebildet werden. Diese können sich zu parallelen oder anti-parallelen β -Faltblättern anordnen und dadurch plattenartige Strukturen, sog. Falblätter, ausbilden. Zwei antiparallele Stränge, die über einen Schleifenbereich miteinander verbunden sind bilden eine β -Haarnadel.^{28,29}

Für die Stabilisierung von β -Strängen, parallelen oder antiparallelen β -Faltblättern und β -Haarnadeln wurden eine Reihe verschiedener Methoden entwickelt (Abbildung 3).^{21,30,31} In einem häufig gewählten Ansatz wird eine Kehlenstruktur oder ein Kehlenmimetikum in eine kontinuierliche Peptidsequenz eingebracht und so die Ausbildung von β -Faltblättern oder β -Haarnadeln begünstigt. Dazu wurden D-Aminosäuren in die Kehlenposition $i+1$ eingebracht, um antiparallele β -Haarnadelstrukturen zu initiieren.³² Ebenso begünstigt eine Kombination aus Prolinen und aromatischen Resten sowie N-alkylierte Aminosäuren in der Kehlenregion die Ausbildung von β -Haarnadeln.³³ Auch Dipeptidtemplate wie beispielsweise D-Pro-L-Pro^{34–36} (**1**) oder Aib(α -Aminoisobuttersäure)-Gly³⁷ wurden für die Initiierung antiparalleler β -Faltblätter bzw. β -Haarnadelstrukturen eingesetzt. Dagegen kann das Templat D-Pro-DADME (1,2-Diamin-1,1-dimethylethan) parallele β -Faltblattstrukturen stabilisieren.^{28,38,39} Außerdem wurden

niedermolekulare Template wie beispielsweise Dibenzofurane⁴⁰ (**2**) oder Oligoharnstoffe³⁰ (**3**) eingesetzt, um die Geometrie einer β -Kehre nachzuahmen und die Synthese dreier verknüpfter β -Stränge zu ermöglichen.³⁰

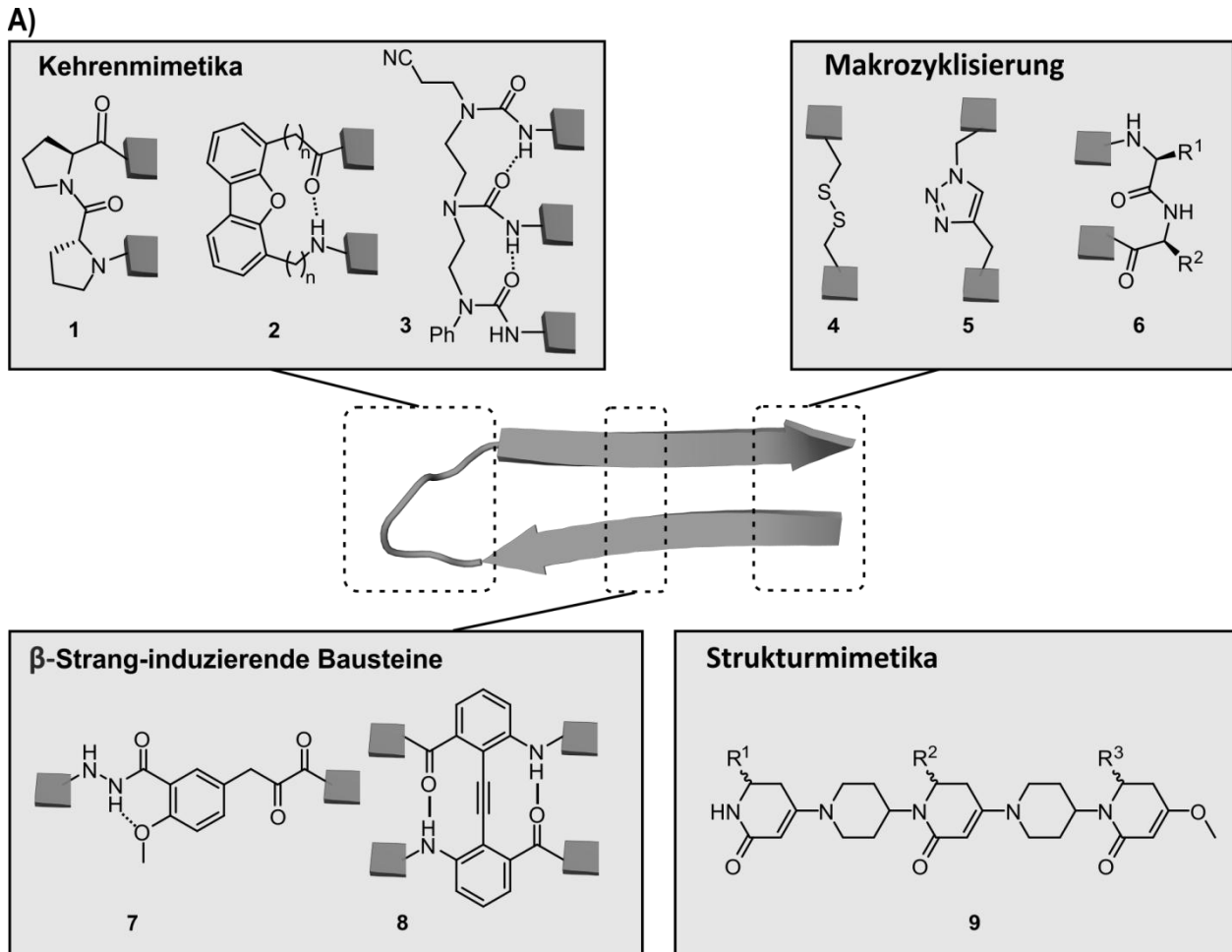


Abbildung 3. Stabilisierung von β -Strang-Strukturen. Beispiele für verschiedene Stabilisierungstechniken und Gerüstmimetika, die für die Adressierung von Protein genutzt wurden.²¹

Durch zusätzliche kovalente und nichtkovalente terminale Verknüpfung oder Verbrückung innerhalb der β -Stränge, sowie durch den Einbau strangstabilisierender Aminosäurebausteine kann das Netz aus Wasserstoffbrückenbindungen unterstützt und einer Entfaltung der β -Faltblätter entgegengewirkt werden. Das Prinzip der Makrozyklisierung findet sich dabei auch in natürlich vorkommenden Peptiden, wo Disulfidbrücken der Stabilisierung von β -Haarnadelkonformationen dienen.⁴¹ Analog wurden auch in andere Peptidsequenzen Cysteine eingebracht und zu Disulfidbrücken (**4**) verknüpft.^{42–44} Ebenso wurde Azid-Alkin-Klickchemie (**5**) verwendet, um β -Haarnadeln durch die Bildung von 1,2,3-Triazolen (**6**) zusätzlich zu stabilisieren.

Kovalente Rückgratverknüpfungen wurden häufig genutzt, um eine Entfaltung aus Richtung des *N*- und *C*-Terminus zu verhindern.^{28,34–39,45}

Weniger häufig wurden nichtkovalente Stabilisierungsmethoden eingesetzt, um durch elektrostatische oder hydrophobe Wechselwirkungen, β -Faltblattstrukturen zu stabilisieren.⁴⁶ Des Weiteren wurden rigide niedermolekulare Bausteine in Peptidsequenzen eingebracht, die der natürlichen Wasserstoffbrückengeometrie nachempfunden sind. So wurden beispielsweise die nichtnatürliche Aminosäure Hao (5-Hydrzino-2-methoxybenzoylsäure, **7**)⁴⁷ oder der Diphenylacetylenbaustein (**8**)⁴⁸ für die Stabilisierung von antiparallelen β -Faltblättern eingesetzt. Weniger intensiv erforscht wurde bisher der Einsatz niedermolekularer β -Strang-Strukturmetika wie Piperidin-Piperidon-Gerüststrukturen (**9**)⁴⁹ die synthetisch deutlich aufwendiger zu realisieren sind. Generell scheint die Stabilisierung von β -Strängen vergleichsweise schwierig zu sein. So führte oftmals erst eine Kombination mehrerer Stabilisierungsstrategien zu einer zufriedenstellenden Molekülgeometrie.²¹ Zudem sind derartige Mimetika bisher nur wenig für ihre Anwendbarkeit als PPI-Inhibitoren untersucht.^{36,42,45,50} Zwei erfolgreiche Beispiele in Bezug auf ihre Wirksamkeit stammen von Robinson und Mitarbeitern (Abbildung 4).^{36,45}

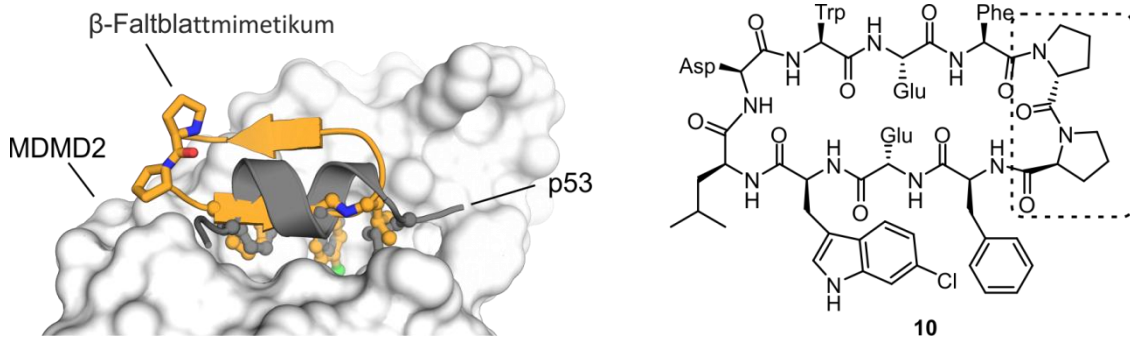


Abbildung 4. Beispiel eines optimierten β -Faltblattmimetikums (orange) (PDB 2AXI) für die Adressierung der p53–MDMD2-Wechselwirkung (grau) (PDB 1YCR). Die ursprünglich von einer p53 α -Helix abgeleitete Peptidsequenz wird durch ein *D*-Pro-*L*-Pro-Templat als makrozyklisierte β -Haarnadel **24** stabilisiert.³⁶

Sie stabilisierten eine Schleife bestehend aus acht Aminosäuren durch Einsatz eines *D*-Pro-*L*-Pro-Templats zu einer Rückgrat-zyklisierten β -Haarnadelstruktur (**24**) und erreichten durch anschließende, iterative Sequenzoptimierung eine mittlere inhibitorische Konzentrationen im submikromolaren Bereich. Allerdings handelt es sich um einen Spezialfall, da die β -Haarnadel nicht von einem entsprechenden Bindungsepitop im Ausgangsprotein abgeleitet ist. Vielmehr bildet das Peptidmimetikum die Seitenkettengeometrie dreier hydrophober Reste ab, die im natürlichen

Proteinkomplex über eine α -Helix vermittelt werden, die in eine definierte Furche auf der Oberfläche von HDM2 eingebettet ist.

2.3 Peptidmimetika von α -Helices

Helices sind mit mehr als 30% das häufigste in Proteinen gefundene Sekundärstrukturelement⁵¹ und stellen daher einen sehr attraktiven Ausgangspunkt für die Generierung von PPI-Inhibitoren dar. Im Laufe der Jahre wurden zahlreiche Methoden zur Stabilisierung α -helikaler Peptidsequenzen entwickelt (Abbildung 5).²² So wurden α -Helix-induzierende Aminosäurebausteine⁵² und α -methylierte Aminosäuren^{53,54} sowie die Koordination von Metallionen genutzt,^{55,56} um den helikalen Sekundärstrukturanteil von Peptiden zu steigern (Klasse A). Zudem konnten mit Architekturen, die die Bindungscharakteristika von α -Helices nachahmen, bereits potente PPI-Inhibitoren generiert werden, darunter Foldamere (peptidähnliche oligomere Strukturen mit definierten Faltungseigenschaften) wie α/β -Peptide⁵⁷ oder Peptide⁵⁸ (Klasse B) oder Strukturgerüste wie Terphenyle (Klasse C).⁵⁹ In Bezug auf die Inhibierung von Protein–Protein-Wechselwirkungen sind die folgenden drei Strategien am intensivsten untersucht: die Kupplung Helix-induzierender, *N*-terminaler Kappen, die kovalente Verbrückung von Helixwindungen und α -methylierte Kohlenwasserstoffverbrückungen (*hydrocarbon peptide stapling*). Letztere Technik ist von wesentlicher Bedeutung für die Betrachtungen dieser Arbeit und wird daher gesondert in Kapitel 2.4 diskutiert.

Die Kupplung *N*-terminaler Kappen, die eine α -helikale Geometrie imitieren, kann die Ausbildung der α -helikalen Konformation in Richtung des C-Terminus induzieren. Beim sog. Wasserstoffbrückenersatz (*Hydrogen bond surrogates*, HBS) handelt es sich um rigide Gerüststrukturen, die die Wasserstoffbrückenbindung der ersten Helixwindung durch eine kovalente Verknüpfung ersetzen. In einer ersten Ausführung wurde dazu eine Hydrazonverbrückung in die Peptidsequenz integriert.⁶⁰ In einer Weiterentwicklung ist diese durch eine vollständig hydrophobe Verbrückung ersetzt, die mit Hilfe von Ringschlussmetathese generiert wird (**11**).^{61,62} Derartige Peptide wurden erfolgreich für die Inhibierung einiger wichtiger PPIs eingesetzt. Mittels HBS stabilisierte Derivate des HIV gp41-Proteins konnten beispielsweise die gp41-vermittelte Zellfusion unterdrückt werden. Zudem wurde eine HBS-stabilisierte p53 Helix zur Inhibierung der p53–MDM2-Wechselwirkung eingesetzt.⁶³ Außerdem nutzten Arora und

Mitarbeiter diese Methode, um eine Helix aus dem RasGEF SOS zu stabilisieren und die SOS-vermittelte Aktivierung von Ras zu hemmen.⁶⁴

Die kovalente Verbrückung von Helixwindungen wird seit langem für die konformative Stabilisierung α -helikaler Peptidsequenzen genutzt, sodass zwischenzeitlich eine diverse Auswahl an Architekturen existiert (Abbildung 5).

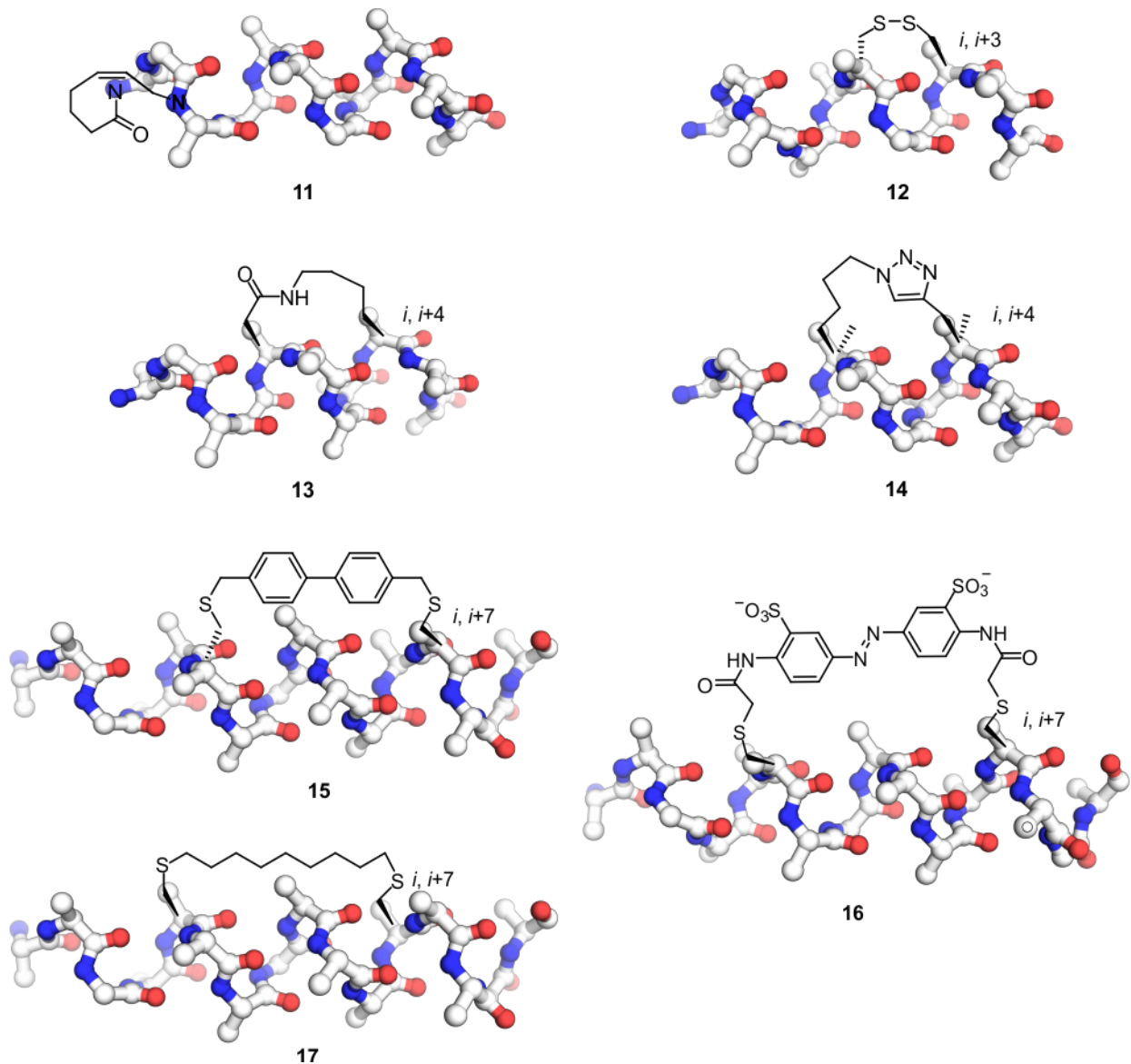


Abbildung 5. Stabilisierung von α -helikaler Strukturen. Beispiele für verschiedene Stabilisierungstechniken und Architekturen.²¹

Da jeweils Reste in den Positionen i , $i + 3$, $i + 4$ bzw. $i + 7$, usw. die gleiche Orientierung aufweisen, bewirken die kovalenten Verbrückungen der Seitenketten solcher Paare eine Stabilisierung der α -helikalen Konformation. Frühe Studien basierten auf einer Quervernetzung von Disulfid-(**12**)⁶⁵ oder Lactambrücken (**13**),⁶⁶ die jedoch anfällig für reduktive bzw. proteolytische Spaltung sind. Die

Disulfidbrücken wurden daher zu Thioethergerüsten weiterentwickelt.⁶⁷ Auch wurde der gleichzeitige Einbau mehrerer Lactambrücken untersucht, um die Stabilität längerer Peptidsequenzen zu verbessern.⁶⁸ Azid-Alkin-Click-Chemie wurde ebenfalls für die Stabilisierung α -helikaler Sequenzen eingesetzt (**14**).^{69,70} Zudem wurden die Seitenketten von L- oder D-Cysteinreste mit verschiedenen niedermolekularen, bifunktionalen Linkergruppen verbrückt. So wurden beispielsweise durch den Einsatz von Diaryl-Verbrückungen (**15**) Peptide mit gesteigerter Zellgängigkeit generiert.⁷¹ Dagegen wurden Azobenzol-basierte Bausteine (**16**) eingebaut, um eine photosensitive Schaltung der α -helikalen Konformation zu erlauben.^{72,73} Cysteine konnten zudem mittels Thiol-en-Reaktion über diverse Dien-funktionalisierte Brücken verknüpft werden (**17**).⁷⁴ Die Verbrückungsarchitekturen unterscheiden sich in ihrer Polarität, ihrer Flexibilität und ihrer Stabilität unter biologischen Bedingungen. Meist hat auch die Position der Verbrückung einen entscheidenden Einfluss auf die Eigenschaften der Derivate. Verbrückte Peptide zeichnen sich zumeist durch einen größeren α -helikalen Charakter, erhöhte Affinitäten und verbesserte Stabilität gegen proteolytischen Abbau aus. In einigen Fällen wurde auch eine erhöhte Tendenz zur zellulären Aufnahme beobachtet. Allerdings zeigen nicht zwangsläufig die Derivate mit dem höchsten Grad an Stabilisierung die größte inhibitorische Wirksamkeit. Ein geringes Maß an Freiheitsgraden minimiert zwar potentiell die entropischen Verluste bei der Bindung der Peptide, allerdings können dadurch auch bioaktive Konformationen ausgeschlossen werden, deren Geometrie geringfügig von der α -helikalen Konformation abweicht.²² Vergleichende Studien, die die Auswirkungen verschiedener Stabilisierungsmethoden zueinander in Relation setzen, sind bisher allerdings selten.⁷⁵

2.4 α -Methylierte, kohlenwasserstoffverbrückte Peptide

Eine zusehends an Popularität gewinnende Variante zur konformativen Stabilisierung α -helikaler Peptidsequenzen sind α -methylierte, kohlenwasserstoffverbrückte Peptide, sog. *hydrocarbon stapled peptides*, die eine Kombination aus einer Seitenkettenverbrückung und den Helix-induzierenden Eigenschaften α -methylierter Reste darstellen. Aufbauend auf einer Studie von Grubbs zur Ringschlussmetathese von allylierten Homo-Serinresten⁷⁶ und dem bereits beschriebenen Einbau α -methylierter Aminosäuren^{53,54} wurde die Methode erstmals im Jahr 2000 von Verdine und Mitarbeitern vorgestellt.⁷⁷ Sie wurde mit der Absicht entwickelt, α -helikale Peptidanaloga mit hoher proteolytischer Stabilität und Zellgängigkeit für die Adressierung

intrazellulärer Protein-Protein-Wechselwirkungen zu generieren.⁷⁷ Die Methode hat jedoch mittlerweile auch breite Anwendung für die Modulation extrazellulärer Zielproteine gefunden.⁷⁸

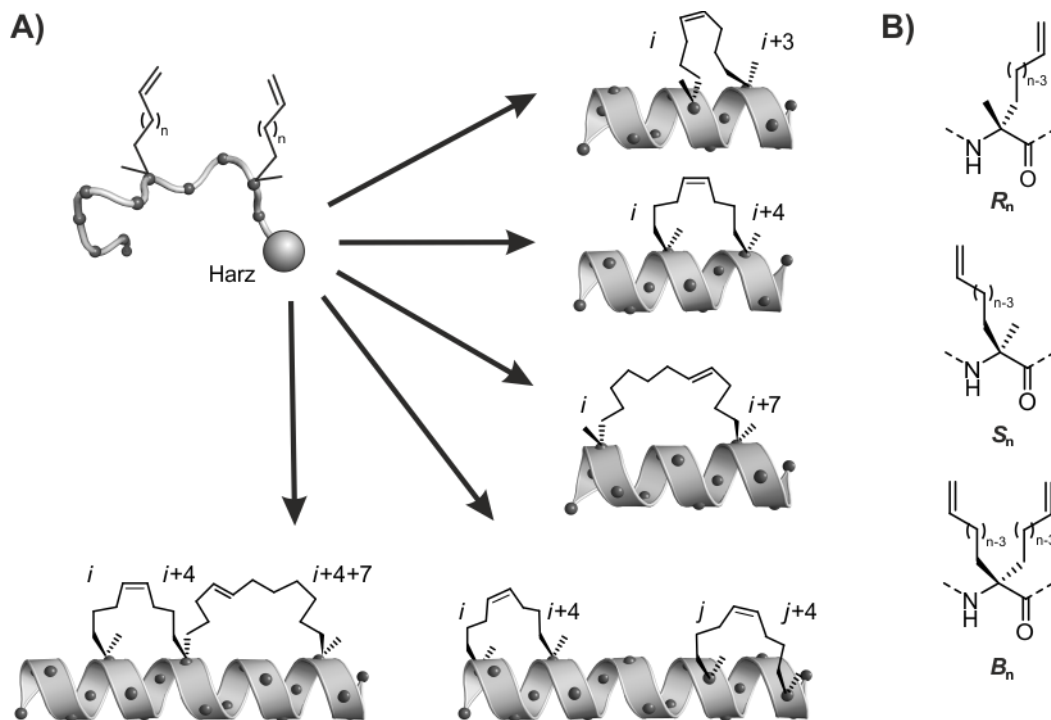


Abbildung 6. Peptide mit α -methylierter Kohlenwasserstoffverbrückung zur konformativen Stabilisierung α -helikaler Peptidsequenzen.⁷⁹ A) Schematische Repräsentation der verschiedenen Verbrückungsarchitekturen. Der Einbau von α , α -disubstituierten Aminosäurebausteinen (B) an definierten Positionen der Peptidsequenz und die nachfolgende Makrozyklisierung mittels Ringschlussmetathese der alkenylfunktionalisierten Seitenketten verknüpft ein oder mehrere Windungen einer α -Helix und bewirkt deren konformative Stabilisierung.

Dabei existieren eine Reihe verschiedener Architekturen (Abbildung 6A).⁸⁰ Durch den Einbau einer hydrophoben Seitenketten-Verbrückung an den Positionen $i, i+3$ ^{81,82} bzw. $i, i+4$ ⁷⁷ wird eine Windung einer α -Helix überbrückt, während der Einbau an den Positionen $i, i+7$ ^{77,83} die Überbrückung zweier helikaler Windungen bewirkt. Dazu werden α -Methyl- α -alkenylaminosäuren (Abbildung 6B) während der Synthese des linearen Peptids an der Festphase eingebracht und durch Ringschlusskreuzmetathese zu einem Makrozyklus geschlossen.⁸⁴ Die unnatürlichen Aminosäure-Bausteine werden mit S_n oder R_n entsprechend ihrer absoluten Konfiguration (S - bzw. R -konfiguriert) und der Anzahl der Kohlenstoffatome (n) in ihrer olefinischen Seitenkette bezeichnet. Diese Synthesestrategie erlaubt eine anschließende Modifizierung des N -Terminus wie z.B. eine Fluoreszenz- oder Affinitätsmarkierung oder eine Acetylierung. Die Länge und absolute Konfiguration der eingebauten α -Methyl- α -alkenylaminosäuren wurden für die einzelnen Architekturen in entsprechenden Studien optimiert, um eine maximale Stabilisierung der α -

helikalen Konformation zu erzielen. Der Einbau einer $i, i+3$ - und $i, i+7$ -Verbrückung erfordert die Verwendung von R -konfigurierten Bausteinen an Position i und von S -konfigurierten Bausteinen an Position $i+3$ bzw. $i+7$.^{77,83} Bei der $i, i+7$ -Architektur umfasst die Länge des Makrozyklus elf Kohlenstoffatome nach Ringschlussmetathese ($R_8 + S_5$).⁷⁷ Bei $i, i+3$ -Architektur existieren hingegen zwei verschiedene Architekturen mit Makrozyklen bestehend aus sechs oder acht Kohlenstoffatomen.⁸¹ Die bisher am weitesten verbreitete Variante ist die $i, i+4$ -Architektur, bei der zwei S -konfigurierte Bausteine eingebaut werden ($S_5 + S_5$), um eine Verbrückung bestehend aus acht Kohlenstoffatomen zu generieren.⁷⁷ Architekturen mit anderen Konfigurationen und Verbrückungslängen sind zwar synthetisch zugänglich, weisen aber oftmals geringere Syntheseausbeuten und ungünstigere biologische Eigenschaften auf. So zeigt beispielsweise die entgegengesetzt konfigurierte Variante der $i, i+4$ -Architektur mit zwei R -konfigurierten Bausteinen ($R_5 + R_5$) eine niedrigere Stabilisierung der α -Helix sowie deutlich geringere Zellgängigkeit.⁷⁷ Um längere Peptidsequenzen zu stabilisieren, können zudem zwei einzelne Verbrückungen eingebaut werden, die sich im Abstand von mehr als vier Aminosäuren befinden, um Kreuzreaktionen zu vermeiden.⁸⁵ Vor Kurzem wurden α -methylierte, kohlenwasserstoffverknüpfte Peptide (*stitched peptides*) entwickelt, die das Peptid an den Positionen $i, i+4, i+4+7$ durch zwei direkt benachbarte Makrozyklen verbrücken und die bisher stärkste Stabilisierung zeigen.⁸⁶ Der Einbau eines zentralen, bifunktionalen Bausteins (Bispentenylglycin, B_5) erlaubt dabei die Synthese zweier verknüpfter Makrozyklen, die als Spirozyklus miteinander verbunden sind.

Mittlerweile sind α -methylierte, kohlenwasserstoffverbrückte Peptide als wichtiges Werkzeug für die Adressierung einer Vielzahl pharmakologisch schwer zugänglicher Zielproteine in biologischen Studien wie auch als vielversprechende Plattform für die pharmazeutische Forschung etabliert.⁷⁹ So wurden beispielsweise selektive Inhibitoren für Wechselwirkungen von Proteinen der Bcl-2-Familie durch Stabilisierung diverser Bcl-2 Homologie 3(BH3)-Domänen, wie BID,^{87,88} BAD,^{88–90} BIM^{91,92} und MCL-1^{93,94} generiert (Abbildung 7A). Diese Proteine spielen eine wesentliche Rolle bei der Kontrolle von Apoptose und Zellüberleben. Des Weiteren wurden durch Stabilisierung einer α -Helix des Tumorsuppressorproteins p53 Inhibitoren für die Wechselwirkung von p53 und seinen negativen Regulatoren MDM2 und MDMX generiert. Im Gegensatz zu niedermolekularen Inhibitoren, die nur die p53–MDM2-Wechselwirkung hemmen können,^{95,96} inhibieren die stabilisierten Helices die Bindung beider negativer Regulatoren gleichermaßen. Sequenzoptimierte Derivate binden MDM2 und MDMX mit niedrig nanomolaren Affinitäten und haben mittlerweile die Phase klinischer Tests erreicht (Abbildung 7B).⁹⁷

Des Weiteren wurden PPI-Inhibitoren für etliche intra- und extrazelluläre Zielproteine generiert,⁷⁹ darunter diverse krebsrelevante Proteinkomplexe wie Untereinheiten des EGF-Rezeptors,⁹⁸ der CSL-MAML1–ICN1-Komplex der NOTCH-Signaltransduktion,⁹⁹ die β -Catenin–TCF4-Wechselwirkung des Wnt Signalweges¹⁰⁰ oder die EZH2-EED-Wechselwirkung bei der Kontrolle der Histon-Lysin-*N*-Methyltransferaseaktivität des PcG-Protein-Komplexes.¹⁰¹ Auch für antivirale und antibakterielle Anwendungen, wie beispielsweise als Hemmstoffe der HIV-1 Partikelbildung^{102–104} oder des mikrobiellen *Multidrug Efflux Systems* (MES)¹⁰⁵ wurden α -methylierte, kohlenwasserstoffverbrückte Peptide bereits erfolgreich eingesetzt.

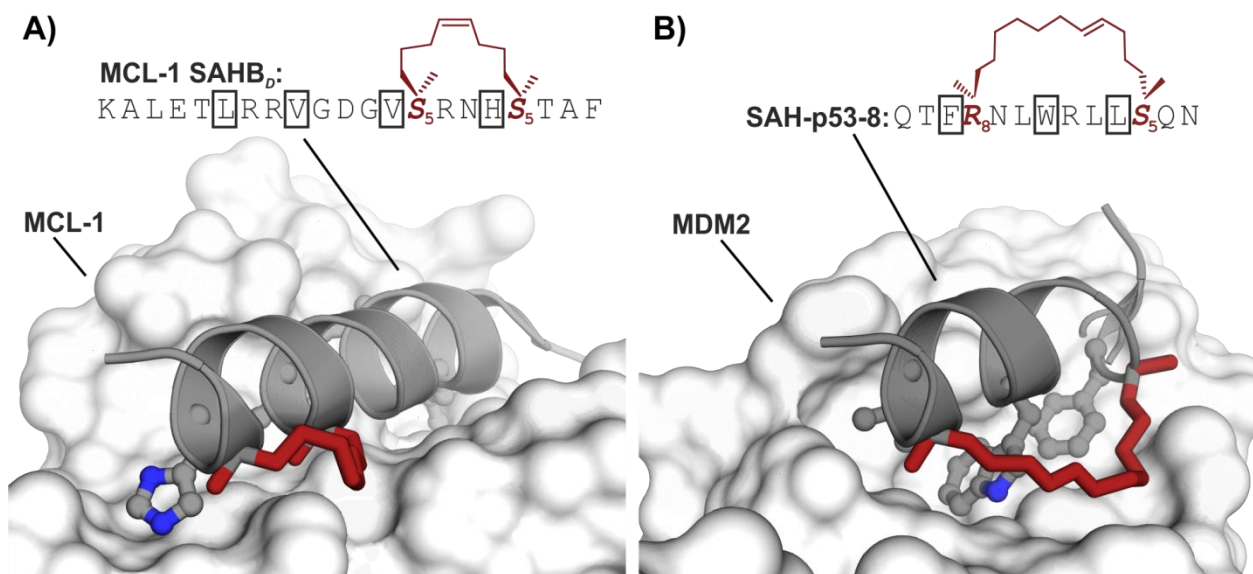


Abbildung 7. Beispiele für Peptide mit α -methylierter Kohlenwasserstoffverbrückung. A) Struktur einer stabilisierten p53 α -Helix gebunden an MDM2. Interagierende Aminosäureseitenketten sowie die *i, i+7*-Verbrückung (rot) sind explizit gezeigt (PDB. 2WP1). B) Struktur einer stabilisierten MCL-1 α -Helix gebunden an MCL-1. Interagierende Aminosäureseitenketten sowie die *i, i+4*-Verbrückung (rot) sind explizit gezeigt. (PDB. 3MK8)

Die kohlenwasserstoffverbrückten Peptide zeichnen sich dabei überwiegend durch eine im Vergleich zum Ausgangspeptid deutlich gesteigerte Helizität und Affinität zum Zielprotein aus.^{79,106} Auch war in vielen Fällen eine verringerte Anfälligkeit für den Abbau durch Proteasen zu beobachten. Manche langen Peptidsequenzen wurden allerdings noch immer proteolytisch angegriffen,¹⁰⁷ was den Einbau mehrerer Verbrückungen erforderlich machte.⁸⁵ Das wohl prominenteste und zugleich am kontroversesten diskutierte Merkmal von α -methylierten, kohlenwasserstoffverbrückten Peptiden besteht in ihrer deutlich erhöhten Tendenz zur Zellgängigkeit.^{108–110} Nach anfänglich großen Erfolgsmeldungen, wurde die Zellgängigkeit der Peptide in jüngerer Zeit zunehmend in Frage gestellt und mit dem Einsatz ausgehungelter Zellen in Serum-freiem Medium in Verbindung gebracht.^{92,111,112} Zellgängigkeit ist generell eine extrem

schwer zu erreichende Peptideigenschaft und stellt oftmals eine wesentliche Limitierung für die Anwendung Peptid-basierter Therapeutika dar.¹¹³ Die Mechanismen der zellulären Aufnahme von *stapled peptides* sind bisher nicht abschließend geklärt und der Erfolg scheint wesentlich von der Platzierung und der Architektur der Verbrückung, sowie der Gesamtladung und Ladungsverteilung der Peptidsequenz abhängig zu sein.¹⁰⁹ Insgesamt besitzen α -methylierte, kohlenwasserstoffverbrückte Peptide daher zwar eine erhöhte Tendenz zur zellulären Aufnahme. Allerdings ist dies nicht allein durch den Einbau der Verbrückung garantiert, sondern erfordert in den meisten Fällen eine zusätzliche Sequenzoptimierung der stabilisierten Derivate.⁷⁹

3 Die Superfamilie kleiner GTPasen

Die Ras-Superfamilie kleiner GTPasen umfasst eine Klasse monomerer, globulärer Proteine mit einem Molekulargewicht von 20–30 kDa, die in Zellen als molekulare Schalter wirken.¹¹⁴ Sie spielen eine wesentliche Rolle bei der zellulären Signalweiterleitung und sind in die Kontrolle essentieller zellulärer Prozesse wie Zelldifferenzierung und Zellfortbestand, Proliferation und die Organisation des Zytoskeletts sowie vesikulärer und Membrantransportprozesse involviert.¹¹⁵ Dafür sind GTPasen in ein komplexes Netzwerk an regulatorischen Proteinen und Effektoren eingebunden, die die zelluläre Lokalisation, Aktivität und Signalweiterleitung von GTPasen über zahlreiche Protein-Protein-Interaktionen (*protein-protein interactions*, PPIs) vermitteln.¹¹⁴ Die Schalterfunktion kleiner GTPasen beruht auf einem Wechsel zwischen einem inaktivierten GDP-gebundenen und einem aktivierten GTP-gebundenen Zustand (Abbildung 8). Die G-Domäne kleiner GTPasen besteht aus einem zentralen sechssträngigen β -Faltblatt umgeben von fünf α -Helices. Sie bindet GDP und GTP mit hoher Affinität, zeigt selbst aber im Allgemeinen nur eine geringe GTPase Aktivität.

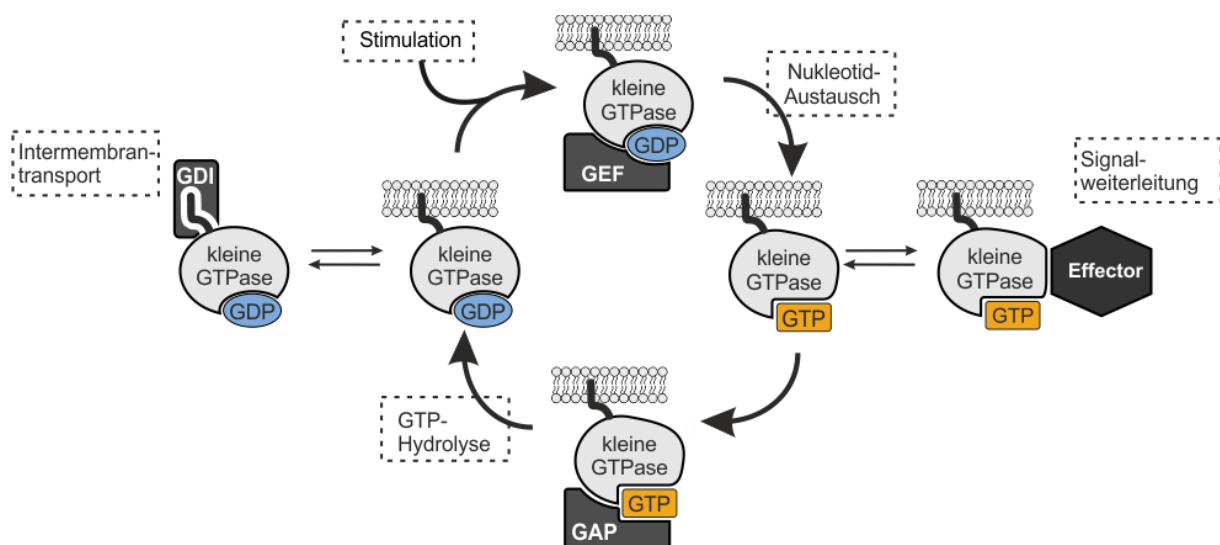


Abbildung 8. Schalterfunktion kleiner GTPasen. GDP-gebundene kleine GTPasen werden durch GEF-katalysierten Nucleotidaustausch aktiviert. In der GTP-gebundenen Form interagieren sie mit verschiedenen Effektorproteinen um zelluläre Signale weiterzuleiten. Die Bindung von GAPs beschleunigt die niedrige intrinsische Hydrolyserate und bewirkt die Inaktivierung zurück zur GDP-gebundenen Form. GDIs solubilisieren die C-terminale, hydrophobe Region und erlauben den intrazellulären Transport zwischen Membranen.⁵

Für die Aktivierung und Deaktivierung sind kleine GTPasen daher auf die Hilfe von Nucleotidaustauschfaktoren (*guanine nucleotide exchange factors*, GEFs) und GTPase-aktivierenden Proteinen (*GTPase activating proteins*, GAPs) angewiesen.¹¹⁶ Die Bindung von GAPs

aktiviert die enzymatische Aktivität kleiner GTPasen und beschleunigt die geringe intrinsische Hydrolyserate. Dagegen erleichtern GEFs die Dissoziation von GDP, stabilisieren den intermediären nukleotidfreien (NF) Zustand und katalysieren den Austausch zu GTP, das zellulär etwa zehnfach höher konzentriert vorliegt. Der Wechsel des Nukleotidbindungszustands geht mit konformativen Änderungen, insbesondere in den sog. *Switch I*- und *Switch II*-Regionen einher.^{117,118} Dies erlaubt GTPasen in der aktivierten Form spezifisch Effektoren zu binden, die die Weiterleitung intrazellulärer Signale vermitteln. Neben der hochkonservierten G-Domäne verfügen die meisten kleinen GTPasen über eine C-terminale hypervariable Region (HVR), die das Ziel unterschiedlicher post-translationaler Modifikationen ist. Durch irreversible (Cysteinylthioether) und reversible (Cysteinylthioester) Lipidierungen und Carboxymethylierung wird die Membranbindung kleiner GTPasen vermittelt und die räumliche und zeitliche Verteilung innerhalb der Zellen kontrolliert.^{119,120} Dazu bilden Guaninnukleotiddissoziationsinhibitoren (GDIs) mit kleinen GTPasen lösliche Komplexe, um sie in ihrem inaktivierten Zustand im Zytosol zu halten oder den Transport zwischen spezifischen Membranen zu ermöglichen (Abbildung 8).¹¹⁶

Die Ras-Superfamilie besteht aus mehr als 150 Mitgliedern und lässt sich in mindestens fünf Unterklassen unterteilen. Neben der Ras-Unterfamilie unterscheidet man Rab-, Ran-, Rho- und Arf-Proteine, die jeweils unterschiedliche biologische Funktionen übernehmen.^{114,121} Die Ras-Unterfamilie zählt in Säugetieren 36 Mitglieder, darunter die namensgebenden Ras-, Ral- und Rap-Proteine. Sie spielen eine Schlüsselrolle bei der Regulation von Proliferation und Zellüberleben.¹²² Die Rab- (*ras related in brain*) und Arf- (ADP-Ribosylierungs-Faktor) Unterfamilien sind hingegen die Hauptregulatoren intrazellulärer Transportprozesse.^{123,124} Rab-Proteine bilden mit mehr als 60 identifizierten Proteinen im menschlichen Organismus die größte Untergruppe kleiner GTPasen. Sie steuern intrazellulären Vesikel- und Membrantransport und vermitteln die Vesikelbildung an der Donormembran sowie die Vesikelverschmelzung mit der Akzeptormembran.^{125,126} Die Arf-Unterfamilie beinhaltet 27 Mitglieder, die ebenfalls in den Vesikeltransport, die Regulation der Endozytose sowie der Sekretionswege involviert sind. Die 22 Mitglieder der Rho- (Ras homologous) Unterfamilie kontrollieren die Aktinorganisation, Zellform und Zellpolarität, Zellmotilität, sowie Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen.¹²⁷⁻¹²⁹ Eine Sonderstellung nimmt die Ran (Ras-related nuclear protein)-GTPase ein, die das einzige Protein der Ran-Unterfamilie ist. Sie ist nicht membrangebunden, sondern liegt frei im Zytosol vor und wird dabei durch einen räumlichen Gradienten zwischen im Zellkern lokalisierten GEFs und zytosolischen GAPs reguliert.^{93,130} Ran ist

dabei ein wichtiger Regulator des Zellkerntransports durch den Kernporenkomplex und der Bildung der mitotischen Spindel.

In Anbetracht ihrer Schlüsselrolle bei der Regulierung vieler zellulärer Prozesse, wird die fehlerhafte Signalwirkung kleiner GTPasen mit der Entstehung und Entwicklung zahlreicher Krankheiten assoziiert. So stehen fehlregulierte GTPasen, allen voran überaktivierte Ras-Proteine, in Verbindungen mit diversen Formen von Krebs. Sie sind aber auch an einer Vielzahl von neurodegenerativen Krankheiten, Entzündungen und Erbkrankheiten beteiligt. So können Mutationen in GEFs oder GTPasen den Nukleotidaustausch und damit die Aktivierung der GTPasen beeinträchtigen. Ebenso verhindert die fehlerhafte Bindung von Effektoren die korrekte Signalweiterleitung.¹³¹ Deutlich häufiger ist aber eine übermäßige Aktivierung kleiner GTPasen und die dadurch intensivierete Signalwirkung die Ursache von Erkrankungen. Dies kann aus einer verstärkten Aktivierung vorgeschalteter Signalwege resultieren, die zu erhöhter GEF-Aktivität und damit einer erhöhten Konzentration an GTP-gebundener Wildtyp-GTPase führt. Ebenso bewirkt ein Ausfall von GAP-Proteinen die Anhäufung aktivierter GTPasen. Eine weitere wesentliche Ursache liegt in Mutationen kleiner GTPasen begründet, die die Hydrolyse-Funktion der GTPasen bzw. die korrekte Bindung von GAP-Proteinen einschränken und so zu einer unkontrollierten Signalweiterleitung führen.¹³² Die Prävalenz der Ursachen ist dabei zwischen den einzelnen Unterfamilien verschieden. So sind beispielsweise Rho-GTPasen nur in seltenen Fällen selbst mutiert, sondern werden bei Krebserkrankungen aufgrund der Überexpression oder Mutation von Wachstumsfaktor-Rezeptoren oder anderer vorangeschalteter Signalwege aktiviert.¹³³ Dagegen finden sich in vielen Krebsformen konstitutiv aktivierte Ras-Proteine, die aufgrund von Mutationen die Fähigkeit zur GTP-Hydrolyse verloren haben.¹³⁴

3.1 Die Ras-Familie

Die Namensgeber der Ras-Superfamilie kleiner GTPasen sind die Ras-Proteine. *Ras*-Gene wurden als erstes in retroviralen Sarkomen in Ratten gefunden (*rat sarcoma*). Sie gehören zu den ersten bekannten Onkogenen und tragen häufig maßgeblich zur Entstehung von Krebs bei.^{135,136} Sie wurden als mutierte Formen zellulärer Proto-Onkogene identifiziert und entsprechend der Stämme, in denen sie identifiziert wurden, als Harvey-Ras (*H-Ras*),¹³⁷ Kirsten-Ras (*K-Ras*)¹³⁸ und Neuroblastoma-Ras (*N-Ras*)¹³⁹ bezeichnet. Die drei humanen *Ras*-Gene codieren vier Proteine mit einer Größe von ca. 21 kDa: H-Ras, N-Ras und die beiden Splicevarianten K-Ras 4A und K-Ras 4B.

Die Sequenzen der vier Ras Isoformen zeigen eine große Homologie innerhalb der G-Domäne (1 - 165), wobei die ersten 85 Aminosäuren in allen vier Isoformen identisch sind und bei den folgenden 80 Aminosäuren noch immer eine Sequenzidentität von ca. 90% besteht.¹⁴⁰ Um die Verankerung in der Plasmamembran zu ermöglichen, durchläuft die C-terminale hypervariable Region (HVR) eine Reihe posttranslationaler Modifikationen, darunter die Farnesylierung und Carboxymethylierung des C-terminalen Cysteinrests. Während H-Ras, N-Ras und K-Ras4a zudem an ein oder mehreren Cysteinresten palmitoyliert werden, weist K-Ras4B eine Polylysine-Einheit auf, um mit der negativ geladenen Plasmamembran in Wechselwirkung zu treten.

Ras-Proteine bilden den zentralen Knoten eines komplexen Signaltransduktionsnetzwerks (Abbildung 9). Die Bindung eines Wachstumsfaktors, wie beispielsweise *Epidermal Growth Factor* (EGF), an Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) bewirkt die Rekrutierung von Ras-spezifischen GEFs zur Plasmamembran und stimuliert dadurch die Aktivierung von Ras.¹²¹ In Säugern werden acht verschiedene GEFs codiert, darunter je zwei Isoformen von *Son of sevenless* (SOS) und *Ras-specific guanyl nucleotide releasing factor* (RasGRF) und vier Isoformen von *Ras-specific guanine-nucleotide-releasing protein* (RasGRP).¹²¹ Alle weisen eine CDC25-Homologiedomäne auf, die den Austausch von GDP zu GTP katalysiert. Am besten charakterisiert ist die Interaktion mit dem Nukleotidaustauschfaktor SOS, der eine wichtige Rolle im *Ras mitogen activated protein kinase* (MAPK)-Signaltransduktionsweg spielt.^{141,142} GTP-gebundenes Ras wiederum interagiert durch ausgedehnte PPIs mit einer Reihe verschiedener Effektorproteine über Ras-bindende-Domänen (RBDs) oder Ras-assoziierte (RA) Domänen. Dadurch werden essentielle nachgeschaltete Signaltransduktionswege, wie der Raf/MEK/ERK, MEKK/SEK/JNK und der PI3K/Akt/NF-KappaB-Weg aktiviert, die eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von Zelldifferenzierung, Zellproliferation und das Zellüberleben einnehmen.¹⁴³

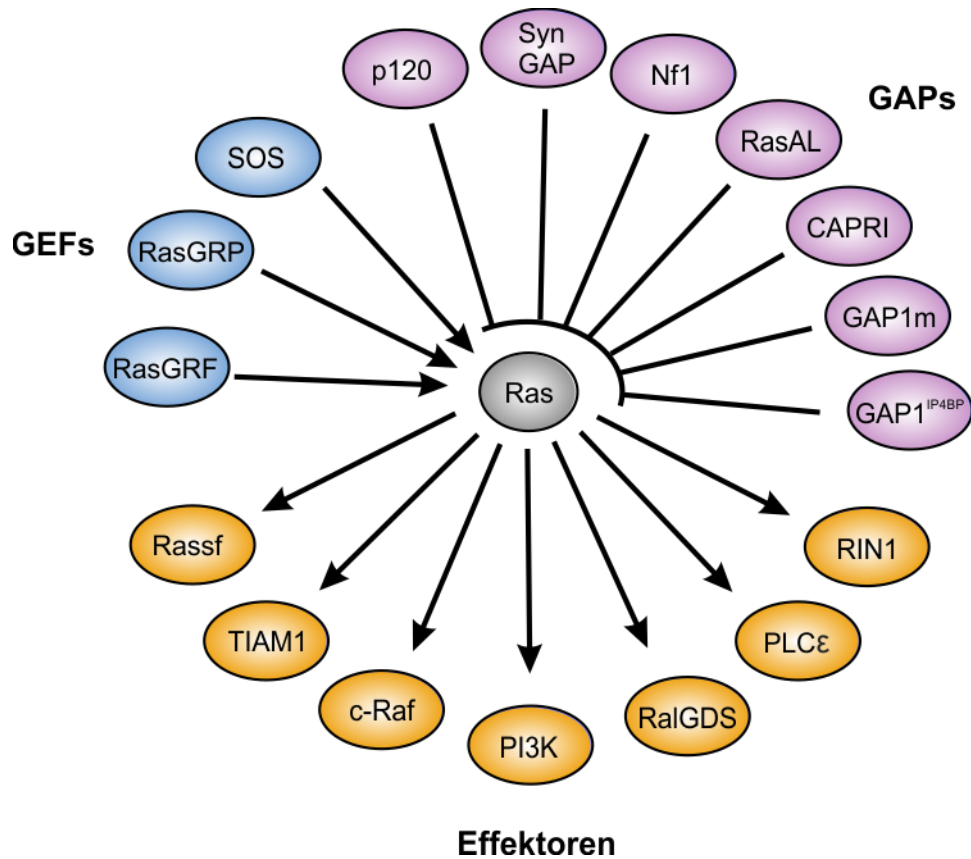


Abbildung 9. Ras interagiert als Knoten zellulärer Signaltransduktionswege (adaptiert von Ahearn et al.¹¹⁹) mit zahlreichen GEFs, GAPs und Effektoren: *Calcium-promoted RAS inactivator* (CAPRI), *GAP1 InsP4-binding protein* (GAP1^{IP4BP}), MAPK/ERK-Kinase (MEK), Neurofibromin 1 (NF1), Phospholipase Cε (PLCε), *Phosphoinositide 3-kinase* (PI3K), *RAL guanine nucleotide dissociation stimulator* (RalGDS), *RasGAP-activating-like* (RasAL); *RAS-specific guanyl nucleotide releasing factor* (RasGRF); *RAS-specific guanine nucleotide releasing protein* (RasGRP); *Ras association domain-containing family* (RasSF); *Ras and Rab interactor 1* (RIN1); *synaptic RasGAP* (SynGAP); *T lymphoma invasion and metastasis-inducing 1* (TIAM1).

Ras selbst zeigt nur eine äußerst geringe GTP-Hydrolyserate ($k_{kat.} \sim 2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), die aber durch Wechselwirkung mit GAP-Proteinen um fünf Größenordnungen gesteigert werden kann.¹⁴⁴ In Säugern existieren sieben verschiedene Ras-spezifische GAPs, wie beispielsweise das p120 RasGAP.¹¹⁶ Diese insertieren einen Arginin-Rest („Arginin-Finger“) in die Nukleotidbindetasche von Ras, der die intermediären, negativen Partialladungen des Übergangszustands der Hydrolysereaktion kompensiert. Zudem bewirkt die Bindung des GAPs eine Umorientierung von Gln61 in der Switch II-Region von Ras, wodurch ein Wassermolekül für den nukleophilen Angriff auf das γ -Phosphat von GTP positioniert wird.¹⁴⁵

Ras-Mutationen finden sich in 20-30% aller menschlichen Tumore und sind zumeist mit schlechten Überlebensprognosen verbunden.^{4,6,146} Die einzelnen Gene sind dabei unterschiedlich häufig mutiert und treten je nach Krebsart unterschiedlich stark in Erscheinung. So ist *K-Ras* das am häufigsten mutierte *Ras*-Gen (86%), gefolgt von *N-Ras* (11%) und *H-Ras* (3%).⁴ Während

beispielsweise in mehr als 80% aller Bauchspeicheldrüsentumore *K-Ras*-Mutationen vorliegen, sind Blasenkarzinome hauptsächlich mit Mutationen im *H-Ras*-Gen assoziiert. Dagegen werden Mutationen im *N-Ras*-Gen vornehmlich bei akuter lymphatischer Leukämie und in Melanomen gefunden.¹⁴⁷ Die häufigsten Ras Mutationen sind an den Resten Gly12, Gly13 und Gln61 lokalisiert (Abbildung 10) und verhindern die intrinsische bzw. GAP vermittelte Hydrolyse von GTP.¹⁴⁷ Mutationen von Gln61 verhindern die korrekte Platzierung des nukleophilen Wassers.^{148,149} Dagegen bewirken Mutationen von Gly12 und Gly13 durch sterische Abschirmung die Platzierung des Arginin-Fingers und behindern die korrekte Orientierung des Ras–GAP-Komplexes.¹⁴⁹ Es kommt zu einer Ansammlung von konstitutiv aktiviertem, GTP-gebundenen Ras und dadurch zu einer übermäßigen Aufrechterhaltung der zellulären Überlebens- und Proliferationssignale.

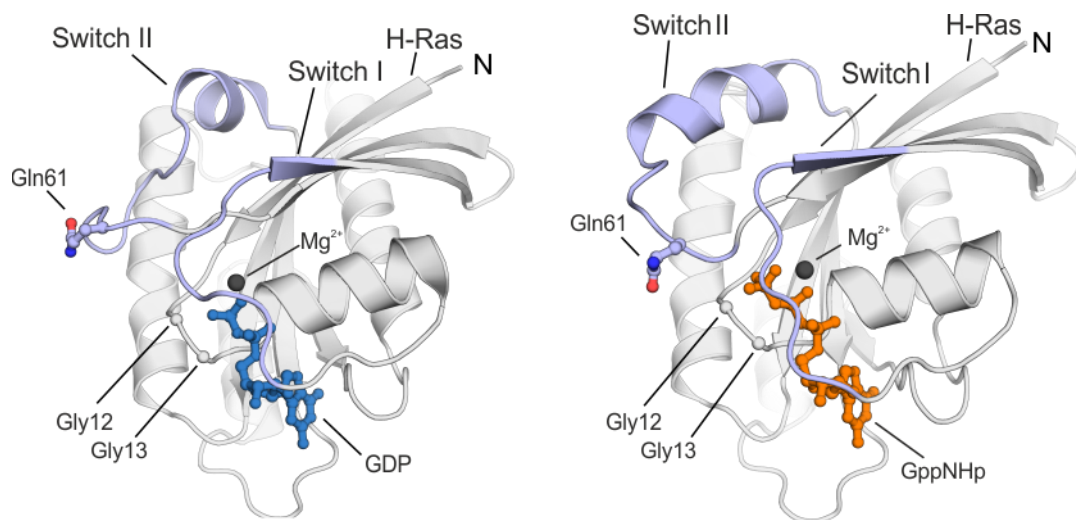


Abbildung 10. Strukturelle Eigenschaften und häufige Mutationen von Ras-Proteinen. Kristallstrukturen der GDP- und GppNHp-gebundenem G-Domäne von H-Ras. (PDB: 1Q21, 5P21). Die flexiblen Switch I- und Switch II-Regionen (hellblau), koordiniertes Magnesium (dunkelgrau) und die Nukleotide (GDP blau und GppNHp orange) sind farblich hervorgehoben. Die häufigsten Mutationen von konstitutiv aktiviertem Ras (Gly12, Gly13 und Gln61) sind explizit dargestellt.⁵

3.2 Die Rab-Familie

Die Familie der Rab-GTPasen bildet mit mehr als 60 Mitgliedern im menschlichen Organismus die größte Untergruppe kleiner GTPasen.^{125,150} Sie enthält zahlreiche Paraloge (z.B. Rab5a, Rab5b und Rab5c), von denen teilweise noch alternative Spleißvarianten existieren. Auf Basis vergleichender Sequenzanalyse können Rab-Proteine nochmals in 14 Unterfamilien eingeordnet werden, die aber nicht zwingend funktionelle Gemeinsamkeiten oder gleiche Interaktionspartner aufweisen.¹⁵⁰ Abseits der für kleine GTPasen konservierten Elemente der G-Domäne teilen Rab-Proteine einige

weitere strukturelle Gemeinsamkeiten. Rab-Familien-Motive (RabF1 - RabF5), die sich um die *Switch I*- und *Switch II*-Regionen herum befinden, unterscheiden Rab-Proteine von anderen Familien kleiner GTPasen. Dagegen erlauben die Rab-Subfamilienmotive (RabSF1 - RabSF4) die Untergliederung in weitere Subfamilien.^{151,152} Die größte strukturelle Heterogenität der Rab-GTPasen befindet sich in den *Switch*-Domänen und der $\alpha 3/\beta 5$ -Schleife benachbart zu *Switch II* und beeinflusst wahrscheinlich die Effektorspezifität.¹⁵³ Die C-terminale HVR von Rab-GTPasen ist je nach Isoform kovalent mit einer, zumeist aber zwei Geranylgeranylgruppen als Cysteinylthioether modifiziert und bedingt vermutlich die subzelluläre Lokalisation.¹²⁵

Wie alle kleinen GTPasen sind auch Rab Proteine für ihre Aktivierung und Deaktivierung auf die Hilfe von GEFs und GAPs angewiesen. Interessanterweise steht der großen Zahl bekannter Rab-Proteine nur eine niedrige Zahl bisher identifizierter RabGEFs und RabGAPs gegenüber.¹¹⁶ RabGEFs besitzen kein einheitliches Strukturmotiv und sind dazu in der Lage mehrere verschiedene Rabs zu adressieren. In Säugern werden Rab-GTPasen durch mindestens vier verschiedene Typen von GEFs mit jeweils unterschiedlichen Mechanismen aktiviert. Die RabGEFs mit einer DENN (differentially expressed in normal and neoplastic cells)-Domäne (18 bekannte Mitglieder)¹⁵⁴ oder mit einer Vps9-Domäne (10 bekannte Mitglieder)¹⁵⁵ enthalten jeweils die konservierte Domäne, sind dabei aber Bestandteile großer Proteinkomplexe, die gleichzeitig auch Effektoren für andere Rab-Proteine darstellen. Dadurch kann die Aktivierung eines Rabs den Nukleotidbindungszustand eines nachgeschalteten Rabs kontrollieren und dergestalt eine Signalfortpflanzung in Form einer Rab-GEF-Kaskade ermöglichen.¹²⁵ Dagegen funktionieren die RabGEFs Rabin8¹⁵⁶ und der TRAPP-Komplex¹⁵⁷ als Homodimere Komplexe mit hoher Substratspezifität.

Aktivierte Rab-GTPasen sind in ein äußerst komplexes molekulares Signalnetzwerk involviert. So können Rab-Proteine mehrere verschiedene Effektoren binden. Ebenso interagieren manche Effektoren mit unterschiedlichen Rab-GTPasen, sodass die jeweilige Funktion auch wesentlich mit der spezifischen subzellulären Lokalisation verknüpft ist.^{123,158,159} Beispielsweise bindet aktiviertes Rab5 an mehr als 20 verschiedene Proteine.¹⁶⁰ Dabei verfügen Effektoren zwar oftmals über Bindedomänen, die für ein bestimmtes Rab spezifisch sind, können aber gleichzeitig mehrere dieser Bindedomänen beinhalten.¹⁶¹ Die intrinsische Hydrolyserate variiert deutlich innerhalb der verschiedenen Rab-Proteine (von $2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ für Rab5 bis $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ für Rab6),^{162,163} ist aber wie bei allen kleinen GTPasen als relativ gering anzusehen. RabGAPs beschleunigen die GTPase-Aktivität und enthalten trotz teils deutlicher struktureller Unterschiede alle eine katalytisch aktive TBC-(Tre2/Bub2/Cdc16)-Domäne. Auch sind sie häufig dazu in der Lage, mit mehreren

verschiedenen Rab-Proteinen zu interagieren.¹⁶⁴ Im Gegensatz zum Mechanismus der RasGAPs reicht dabei neben dem „Arginin-Finger“ noch ein konservierter Glutamin-Rest in die Nukleotidbindungstasche, der die Wirkung eines Rab eigenen Glutamins ersetzt.¹⁶⁵

Rab-GTPasen regulieren zahlreiche Aspekte vesikulärer und Membrantransportprozesse wie die Bildung von Vesikeln an der Donormembran, das Sortieren des Transportguts, die Translokation von Vesikeln am Zytoskelett sowie die Anbindung und Verschmelzung mit der Zielmembran. Sie kontrollieren die räumliche und zeitliche Organisation des exozytotischen und endozytotischen Transportwegs, den vesikulären Transport zwischen Zellkompartimenten und das Recycling von Membranen.¹²⁵ Dadurch sind sie in verschiedene essentielle Prozesse wie dem Recycling von Rezeptoren, der Ausschüttung von Botenstoffen und der Regulation von Zellwachstum, -viabilität und – metabolismus involviert. Die fehlerhafte Funktion von Rab-GTPasen wird daher zunehmend mit einer Reihe von vererbten und erworbenen Krankheiten in Verbindung gebracht, darunter neurodegenerative Erkrankungen, Diabetes und verschiedene Formen von Krebs.^{131,166} Diese gehen sowohl auf direkte Mutationen von Rab GTPasen als auch auf Störungen innerhalb der regulatorischen Ebene zurück. So stehen beispielsweise Mutationen an hoch konservierten Resten der Oberfläche von Rab7, das den endozytotischen Transport zu den Lysosomen reguliert, direkt mit der Marie-Tooth Typ 2B-Krankheit in Verbindung. Hier bedingen Punktmutationen einen beschleunigten Nukleotidaustausch und beeinträchtigen die GTP-Hydrolyse, sodass es zu einer Ansammlung von aktiviertem Rab7(GTP) kommt.¹⁶⁷ Dagegen bedingt die Überexpression von Rab25, welches in das Recycling bestimmter Integrine involviert ist, eine aggressivere Metastasierung und schlechte klinische Prognosen in Ovarial- und Mammakarzinomen.¹⁶⁸ Konstitutiv aktivierte Rab8 Mutanten wurden dagegen mit MT1-Matrix Metalloproteinase (MT1-MMP) vermittelter Invasion von Krebszellen in Verbindung gebracht, jedoch ist die genaue Wirkungsweise noch unklar.¹⁶⁹ Rab8 spielt eine wichtige Rolle beim exozytotischen Transport vom Trans-Golgi-Netzwerk bzw. Recyclingendosom zur Plasmamembran.¹⁷⁰ Hohe Expressionslevel von Rab8 wurden zudem mit einer gesteigerten Resistenz gegen *cis*-Platin assoziiert.¹⁷¹

3.3 Modulierung der Signalwirkung kleiner GTPasen

Aufgrund ihrer Bedeutung bei der Entstehung und Entwicklung verschiedener Erkrankungen, stellen kleine GTPasen vielversprechende Ansatzpunkte für die Medikamententwicklung dar. Dies hat sich in der Vergangenheit jedoch als äußerst schwierig erwiesen, sodass nach mehr als vier

Jahrzehnten intensiver Bemühungen von Seiten der akademischen und industriellen Forschung bisher kein Medikament gegen kleine GTPasen auf den Markt gebracht werden konnte.^{5,134,135,146} Vielmehr gelten kleine GTPasen heutzutage weithin als pharmakologisch unzugänglich („undruggable“). Das wesentliche Problem besteht darin, dass Mitglieder der Ras-Superfamilie abseits der Nukleotidbindetasche, keine offensichtlich adressierbaren Oberflächenmerkmale aufweisen. Während im Fall von Kinasen zahlreiche spezifische Inhibitoren entwickelt wurden, die wirksam um die ATP-Bindetasche konkurrieren,¹⁷² wurden bisher keine wirksamen Moleküle für die GDP/GTP-Bindetasche kleiner GTPasen gefunden. Dies ist unter anderem damit zu erklären, dass Kinasen ATP mit Affinitäten im mikromolaren Bereich binden, wohingegen GTPasen üblicherweise Affinitäten im pikomolaren Bereich aufweisen.¹⁷³ Sowohl Bibliotheken von modifizierten Nukleotidanaloga,^{174,175} als auch Hochdurchsatz-Screening (HTS)^{176,177} brachten bisher lediglich Derivate mit moderaten Affinitäten und geringer inhibitorischer Wirkung hervor. In Anbetracht millimolarer intrazellulärer Nukleotidkonzentrationen erscheint diese Strategie daher als wenig erfolgversprechend.

Die Signalweiterleitung und ein Großteil der Regulation kleiner GTPasen wird über ausgedehnte und gering profilierte PPIs vermittelt, die mit klassischen Methoden der medizinischen Chemie nicht zugänglich waren.^{5,134} Bisherige Ansätze konzentrierten sich daher auf vor- und nachgeschaltete Positionen der jeweiligen Signalkaskaden oder versuchten, die räumliche und zeitliche Organisation der GTPasen zu stören (Abbildung 11A).

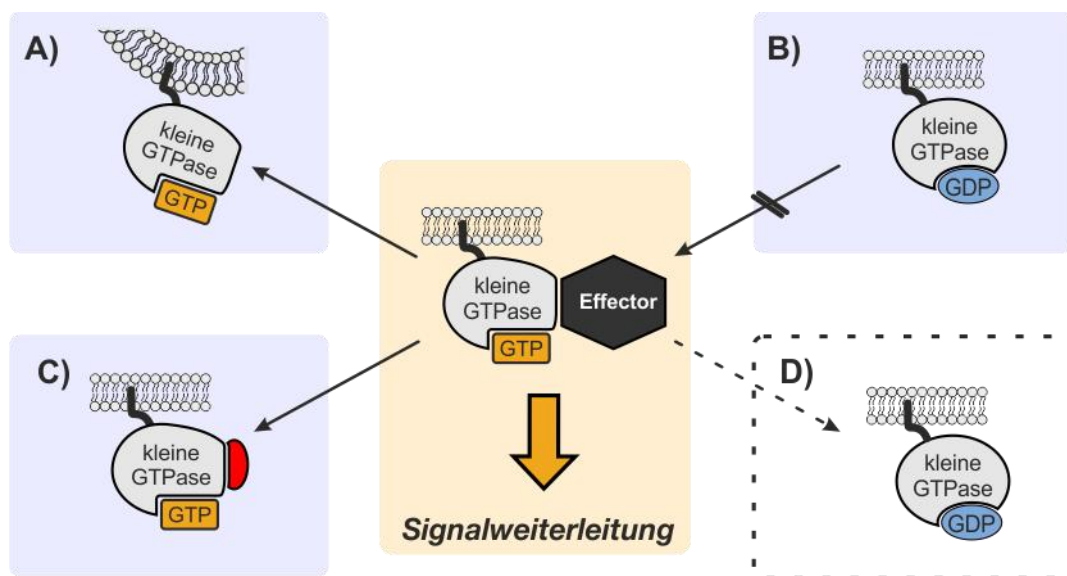


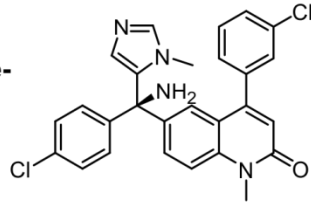
Abbildung 11. Bisherige Strategien zur Modulation der Signalaktivität kleiner GTPasen. A) Störung der GTPase-Lokalisation. B) Störung der GTPase-Aktivierung durch Inhibition der GTPase–GEF-Wechselwirkung, irreversible, kovalente Modifikation. C) Stabilisierung einer inaktiven Konformation; orthosterische oder allosterische Inhibition der GTPase–Effektor-Wechselwirkung. D) Erhöhung der GTP-Hydrolyserate.⁵

Die mit Abstand größten Anstrengungen wurden aufgrund ihrer herausragenden Stellung bei der menschlichen Krebsentstehung für Ras-Proteine unternommen.¹⁷⁸ Die entscheidende posttranslationale Modifikation von Ras ist die C-terminale Farnesylierung durch Farnesyltransferase. Sie ist essentiell für die Verankerung in der Plasmamembran und damit für die korrekte Lokalisation und Funktion der Ras-Proteine. Diese Entdeckung motivierte in den 1990er Jahren intensive Anstrengungen für die Entwicklung von Farnesyltransferase Inhibitoren (FTIs).¹⁷⁹ Trotz guter Ergebnisse in vorklinischen Studien und Tiermodellen, scheiterten diese Moleküle jedoch letztlich in der späten Phase klinischer Studien an mangelnder Wirksamkeit im menschlichen Organismus.¹⁷⁹ Inhibitoren wie Lonafarnib¹⁸⁰ (**18**, Abbildung 12) oder Tipifarnib¹⁸¹ (**19**) blockierten zwar die Membranbindung der H-Ras-Isoform, zeigten aber keine Wirksamkeit für die deutlich häufiger mutierten K-Ras- und N-Ras-Proteine, da diese auf unerwartetem alternativen Weg durch Geranylgeranyltransferase I mit einer Geranylgeranyl-Einheit modifiziert werden können.¹⁸² Aktuelle Bemühungen konzentrieren sich daher darauf, die Ras nachgeschalteten Kinasen des Raf-MEK-ERK- und PI3K-Akt-Signalwegs zu inhibieren und resultierten in spezifischen Kinaseinhibitoren.¹⁸³ Allerdings beeinträchtigen Resistenzbildungen, sowie komplexe und teils noch unzureichend verstandene Rückkopplungsmechanismen die klinische Wirksamkeit dieser Moleküle und können paradoxerweise sogar entgegengesetzte Effekte bewirken. Beispielsweise verursachte der B-Raf-Inhibitor Vemurafenib (**20**) eine rasche Feedback-Aktivierung des EGF-Rezeptors und dadurch verstärkte Proliferationssignale.¹⁸⁴ MEK-Inhibierung führte hingegen zu einer verstärkten Signalwirkung aufgrund von Hyperaktivierung der RTK ErbB3 und scheiterte an mangelnder Wirksamkeit in klinischer Phase III.¹⁸⁵ Vor kurzem waren allerdings erste weiterentwickelte Inhibitoren, wie der B-Raf-Inhibitor PLX8394 (**21**), dazu in der Lage, gewisse Resistenzmechanismen zu überwinden und die paradoxe Aktivierung zu umgehen.¹⁸⁶

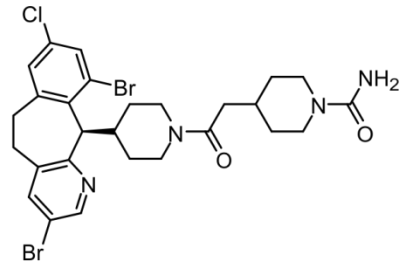
Daneben wurde auch der phänotypische Ansatz des sog. *Synthetic Lethal Screening* auf der Suche nach kleinen Molekülen verfolgt, die dazu in der Lage sind, selektiv das Wachstum von Ras-mutierten Krebszellen zu hemmen. In einigen Studien wurden dabei mögliche Leitstrukturen identifiziert, deren zelluläre Ziele jedoch nicht abschließend geklärt werden konnten. Auch variierten die Ergebnisse teils deutlich je nach verwendeter Zelllinie, sodass ein Ras-spezifischer Wirkmechanismus erst noch validiert werden muss.¹⁸³

3 Die Superfamilie kleiner GTPasen

Farnesyltransferase-Inhibitoren

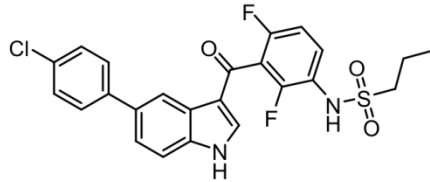


Tipifarnib **18**

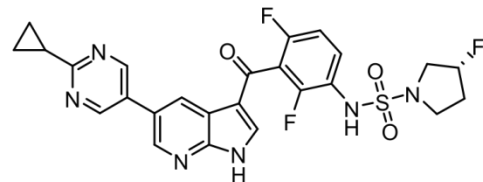


Lonafarnib **19**

Kinase-Inhibitoren

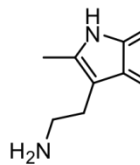


Vemurafenib **20**
B-Raf

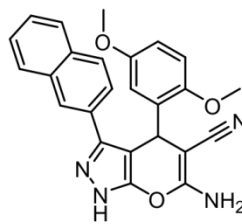


PLX8394 **21**
B-Raf

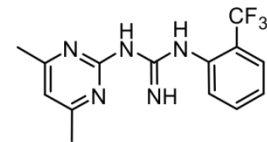
GTPase-GEF-Inhibitoren



DCAI **22**
Ras-SOS

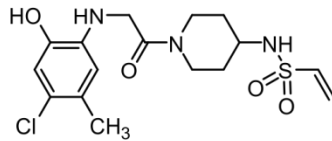


RBC8 **23**
Ras-SOS

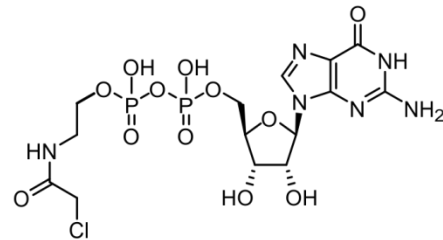


ZINC69391 **24**
Ras-SOS

Kovalente Inhibitoren

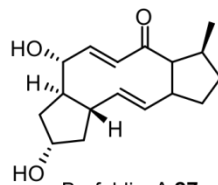


VSA8 **25**
K-Ras(G12C)

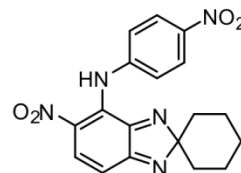


SML-8-73-1 **26**
K-Ras(G12C)

PPI Stabilisatoren

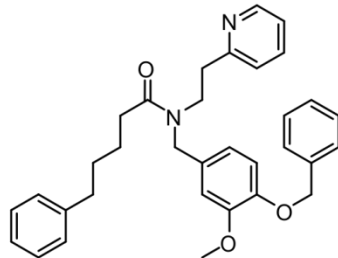


Brefeldin A **27**
Arf-ARNO

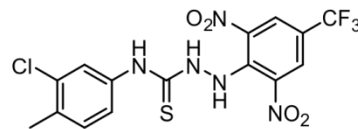


LM11 **28**
Arf-ARNO

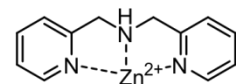
GTPase-Effektor Inhibitoren



MCP110 **29**
Ras-Effektor
(orthosterisch)



Kobe0065 **30**
Ras-Effektor
(orthosterisch)



Zn²⁺-BPA **31**
Ras-Effektor
(allosterisch)

Abbildung 12. Auswahl einiger niedermolekularer Moleküle, die die Signalwirkung kleiner GTPasen modulieren. Das jeweilige Zielprotein und der Wirkmechanismus sind angegeben.

Auf der Suche nach alternativen Ansatzpunkten wurde daher nach Substanzen gesucht, die dazu in der Lage sind, an kleine GTPasen zu binden und die PPIs mit regulatorischen Proteinen oder Effektoren direkt zu modulieren.⁵ Frühe Studien lieferten erste niedermolekulare Verbindungen, Peptide oder Peptid-Derivate, die jedoch unter geringer zellulärer Aufnahme und Wirksamkeit oder unzureichend validierten Wirkmechanismen litten.^{187–189} Das Scheitern der indirekten Modulatoren von Ras-Proteinen in der späten klinischen Phase, wie auch ein neues Verständnis der Biologie und Struktur kleiner GTPasen sowie technologische Fortschritte bei der Adressierung schwieriger PPIs leitete jedoch in den letzten Jahren eine regelrechte Renaissance des Feldes ein.⁵ Die zahlreichen Studien lassen sich entsprechend der verwendeten Strategie in verschiedene Kategorien ordnen (Abbildung 11B - D). Bei dem am weitesten verbreiteten Ansatz soll die Aktivierung der GTPase durch vorgeschaltete Signalwege verhindert werden. So wurden orthosterische Inhibitoren von GTPase–GEF-Wechselwirkungen entwickelt. Mit Hilfe von Hochdurchsatz-Screens von Fragmentbibliotheken und strukturgestützter Optimierung wurden orthosterische Inhibitoren Ras–SOS-Wechselwirkung wie beispielsweise die Verbindung DCIA (**22**) generiert.^{190–193} Mit einer ähnlichen Strategie wurden in Hochdurchsatzverfahren und durch computergestützte Analysen orthosterische Inhibitoren von Ral–GEF- (z.B. RBC8 **23**)¹⁹⁴, Rho–GEF- (z.B. ZINC69391, **24**)^{195–198} und Rac–GEF-Wechselwirkungen aus verschiedenen Substanzbibliotheken identifiziert. Zudem wurden kovalente Inhibitoren wie das Vinylsulfonamid VSA8 (**25**) oder das Nukleotidanalogen SML-8-73-1 (**26**) generiert, die mutantenselektiv an den Cysteinyl-Rest der K-Ras(G12C)-Mutation binden und dadurch die GTPase in ihrer inaktivierten Form einfrieren.^{199,200} Einer der potentesten Inhibitoren der Nukleotidaustauschreaktion ist wahrscheinlich der Naturstoff Brefeldin A (**27**). Er stabilisiert einen ternären Komplex von Arf(GDP) und dem zugehörigen GEF ARNO in einer inaktiven Konformation und blockiert so die Nukleotidaustauschreaktion.^{201,202} Diese Entdeckung inspirierte die Entwicklung von LM11 (**28**), einem Stabilisator des Arf–ARNO-Komplexes²⁰³ und motivierte Versuche, Stabilisatoren der Ras–SOS-Wechselwirkung zu entwerfen.²⁰⁴ In einer Studie von Patgiri et al. wurde dagegen kürzlich die α H-Helix aus SOS als Ausgangspunkt für die Synthese Peptid-basierter Ras–SOS-Inhibitoren genutzt.²⁰⁵ Dafür wurde die Sequenz zunächst auf bessere Löslichkeit optimiert und anschließend mittels Wasserstoffbrückenersatz (HBS) konformativ stabilisiert.⁶⁴ Das beste Derivat zeigte dabei eine Dissoziationskonstante von $K_D = 158 \mu\text{M}$ für die GDP gebundene, sowie von $K_D = 28 \mu\text{M}$ für die nukleotidfreie Form von H-Ras und war dazu in der Lage, den SOS vermittelten Nukleotidaustausch *in vitro* und ERK Phosphorylierung *in vivo* zu unterdrücken. Allerdings war

trotz der vergleichsweise großen Interaktionsfläche die Affinität zu Ras(GDP) selbst für das beste Derivat noch um mehr als das ca. 10-fache niedriger als die Affinität des Ausgangsproteins SOS ($K_D = 14.5 \mu\text{M}$). Generell kann das Potential von Ras-GEF-Inhibitoren im Fall von konstitutiv aktiviertem Ras noch nicht abschließend abgeschätzt werden.¹³⁴ Obgleich diese Moleküle möglicherweise geringe Auswirkungen auf dauerhaft aktivierte Ras-Proteine zeigen, könnten sie dennoch Antitumorwirkung über eine vorhandene Ras-Wildtyp-Population entfalten.^{206–208} So wurden beispielsweise in jüngerster Zeit Effekte niedermolekularer GEF-Inhibitoren auf Zellen mit mutiertem *Ras* nachgewiesen.¹³⁴

Die Adressierung von GTPase-Effektor-Wechselwirkungen zielt darauf ab, die Weiterleitung an nachgeschaltete Signalkaskaden zu unterbinden, was insbesondere im Fall konstitutiv aktivierter GTP-gebundener GTPasen von Vorteil sein könnte. So wurde die Wirksamkeit orthosterischer Ras-Effektor-Inhibitoren bereits prinzipiell mit Hilfe von Antikörper-Fragmenten gezeigt, die die Effektor-Bindestelle von H-Ras-GTP blockieren.²⁰⁹ Indem diese die Wechselwirkung von mutiertem Ras mit Effektoren unterdrücken, konnte die Tumorbildung im Lungenkrebsmodell transgener Mäuse verhindert werden.²¹⁰ Niedermolekulare, orthosterische Inhibitoren der Ras-Raf-Wechselwirkung wie Verbindung MCP110 (**29**) oder Kobe0065 (**30**) wurden in unterschiedlichen Assay-Setups aus Substanzbibliotheken identifiziert.^{211–213} Die Entdeckung eines dynamischen Wechsels zwischen verschiedenen Konformationen GTP-gebundener GTPasen und deren unterschiedliche Effektor-Affinität, sowie die Identifikation transienter Taschen auf der Ras-Oberfläche motivierte die Suche nach allosterischen Ras-Inhibitoren, wie dem Metallkomplex Zn^{2+} -Bis(2-picolyl)amin (BPA, **31**).^{214–216}

Ein weiterer attraktiver Ansatz besteht prinzipiell in der Induktion bzw. Beschleunigung der GTP-Hydrolyse durch die Generierung synthetischer GAPs, um die Konzentration an aktivierten GTPasen und damit die krankhafte Signalweiterleitung zu verringern. Diese Substanzen würden dabei katalytisch wirken und müssten daher keine übermäßig hohen Affinitäten bzw. Umsatzraten aufweisen. Die Suche nach GTPase-aktivierenden kleinen Molekülen für mutiertes Ras scheiterte aber bisher.^{217,218} Aufgrund der strukturellen Gegebenheiten der aktivierenden Mutationen erscheint eine Umsetzung zudem als äußerst schwierig.¹³⁴ Mutationen der Glycin-Reste in Position 12 und 13 blockieren durch gesteigerten sterischen Anspruch der Aminosäureseitenketten den Eintritt des katalytisch wirksamen GAP-Arginin-Fingers in die Nukleotidbindetasche und verhindern zudem die korrekte Orientierung von Gln61 in der Ras Switch II-Region (Abbildung 10). Dies stellt jedoch ebenso ein Hindernis für therapeutisch wirksame Moleküle dar, die zunächst

eine Konformationsänderung von Ras induzieren müssten, um die Bindetasche zugänglich zu machen. Mutationen von Ras Gln61 deplatzen hingegen das für die Hydrolyse entscheidende Wassermolekül, sodass eine Verbindung einen gänzlich anderen Hydrolyse-Mechanismus erlauben müsste.¹⁷⁸ Allerdings können in weitaus weniger häufigen Fällen auch Mutationen in RasGAP Allelen eine Einschränkung der GAP-Aktivität und dadurch eine gesteigerte Signalwirkung von Ras bewirken.²¹⁹ In derartigen Fällen, müssten Verbindungen tatsächlich nur eine artifizielle GAP-Aktivität aufweisen.

Trotz zahlreicher Studien zur direkten Adressierung kleiner GTPasen und ersten Erfolge in jüngster Zeit, leiden die bisher entwickelten Moleküle zum Großteil unter geringer Affinität zum Zielprotein sowie unzureichender zellulärer Aufnahme und Wirksamkeit. Obwohl auf den Oberflächen kleiner GTPasen zwischenzeitlich transiente Bindungstaschen identifiziert wurden, welche die Bindung niedermolekularer Substanzen erlauben, haben die meisten derartigen Moleküle Fragmentcharakter und weisen nur eine relativ geringe Interaktionsfläche und Affinität auf.²²⁰ In den meisten Fällen handelt es sich um Machbarkeitsstudien, die prinzipiell die Adressierbarkeit von GTPase-Protein-Wechselwirkungen unterstreichen, aber nicht dazu in der Lage sind die PPIs kleiner GTPasen wirksam zu modulieren. Für die Generierung von PPI-Inhibitoren ist daher eine weitergehende Optimierung oder der Einsatz gänzlich anderer Chemotypen erforderlich.^{5,134} Mögliche derartige Kandidaten sind Makrozyklen und Peptide, die eine deutlich größere Interaktionsfläche bieten können, um mit den flachen und ausgedehnten Proteinoberflächen kleiner GTPasen in Wechselwirkung zu treten. Einige Beispiele in jüngerer Zeit zeigten bereits die prinzipielle Anwendbarkeit von Peptiden für die Adressierung kleiner GTPasen, litten jedoch ebenfalls noch an geringer Affinität sowie unzureichender zellulärer Aufnahme und Wirksamkeit.^{64,188,221}

4 Zielsetzung der Arbeit

Die Regulierung und Signalweiterleitung kleiner GTPasen wird über Wechselwirkungen ausgedehnter und gering profilierter Proteinoberflächen vermittelt, die mit Hilfe traditioneller, niedermolekularer Verbindungen sehr schwer direkt zu adressieren sind. Indirekte Strategien zur Singalmodulierung kleiner GTPasen, wie die Inhibition nachgeschalteter Kinasen oder die Hemmung posttranslationaler Modifikationen, zeigten jedoch bisher keine ausreichende Wirksamkeit im menschlichen Organismus. Einige kürzlich beschriebene Binder kleiner GTPasen zeigen prinzipiell deren direkte Adressierbarkeit. Jedoch litten auch diese Verbindungen zumeist unter niedrigen Affinitäten und geringer zelluläre Wirksamkeit.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher der Einsatz Peptid-basierter Sekundärstrukturmimetika als PPI-Inhibitoren kleiner GTPasen untersucht werden. Diese Substanzklasse erlaubt es, die Seitenkettenfunktionalitäten definierter Bindungsepitope in chemisch stabilisierte Moleküle zu transferieren und bietet im Vergleich zu niedermolekularen Verbindungen größere Wechselwirkungsflächen. In Anbetracht der herausragenden Rolle bei der Entstehung und Entwicklung zahlreicher Krebserkrankungen war dabei die Familie der Ras-Proteine von besonderem Interesse. Zum anderen wurden Rab-Proteine als die größte Unterfamilie kleiner GTPasen für eine genauere Untersuchung ausgewählt. Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Kontrolle vesikulärer Transportprozesse in Zellen und werden zunehmend mit einer Reihe menschlicher Erkrankungen in Verbindungen gebracht.

Dabei war geplant, die Wechselwirkung kleiner GTPasen mit verschiedenen Arten von Interaktionspartnern zu adressieren, um unterschiedliche Aspekte ihrer Regulation und Signalweiterleitung zu modulieren. So können Inhibitoren von GTPase–GEF-Wechselwirkungen die Aktivierung der GTPase hemmen. Die Inhibition von GTPase–Effektor-Wechselwirkungen erlaubt dagegen möglicherweise, gleichzeitig die Signalweiterleitung an verschiedene nachgeschaltete Signalwege zu blockieren. Außerdem könnte die Signalwirkung von Ras-GTPasen durch Moleküle mit artifizieller GAP-Aktivität beeinflusst werden und so eine Deaktivierung von GTP-gebundenem GTPasen bewirken.

Die Gestaltung der Peptid-basierten PPI-Inhibitoren war ausgehend von strukturellen Daten bekannter GTPase–Protein-Komplexe geplant. Dazu sollten systematisch die strukturell charakterisierten Proteinkomplexe zwischen GTPasen und deren Interaktionspartnern untersucht und in den Bindungsdomänen α -Helices und β -Stränge identifiziert werden, die einen

wesentlichen Anteil zur Wechselwirkung beitragen. Die entsprechenden Peptidsequenzen sollten anschließend durch chemische Modifikation in ihrer bioaktiven Konformation stabilisiert werden. Dabei war geplant, die Stabilisierung der β -Stränge durch Zyklisierung der Termini sowie Seitenkettenverknüpfungen innerhalb der Sequenzen zu vermitteln. Für die konformative Stabilisierung α -helikaler Bindungsepitope war hingegen die Synthese α -methylierter, kohlenwasserstoffverbrückter Peptide (*hydrocarbon stapled peptides*) als bisher erfolgreichste Variante α -helikaler Peptidmimetika vorgesehen. Die Peptide sollten mittels Fmoc-basierter Festphasensynthese (*solid-phase peptide synthesis, SPPS*) aufgebaut und auf ihre Affinität zu den Zielproteinen untersucht werden. Für geeignete Kandidaten war zudem eine weitergehende Affinitätsoptimierung durch Variation der Peptidsequenzen und Verbrückungsarchitekturen geplant. Des Weiteren sollte eine strukturelle Charakterisierung der GTPase–Peptid-Komplexe sowie eine funktionale Charakterisierung der *in vitro* und *in cellulo* erfolgen.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Synthese α -helikal stabilisierter Peptide

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Stabilisierung von Bindungsepitopen basiert auf dem Einbau nicht-natürlicher Aminosäuren in die jeweiligen Peptidsequenzen und deren anschließender Makrozyklisierung. Einige dieser Bausteine waren nicht kommerziell verfügbar bzw. wurden in größeren Mengen benötigt und daher anhand etablierter Synthesemethoden hergestellt. Für die Stabilisierung von β -Faltblättern wurde eine Reihe verschiedener Zyklisierungsarchitekturen getestet, bei denen die Schutzgruppenstrategie und Syntheseprotokolle abhängig von der jeweiligen Peptidsequenz angepasst wurden. Die Stabilisierung α -helikaler Peptidsequenzen erfolgte durch den Einbau α -methylierter Kohlenwasserstoffverbrückungen und Wasserstoffbrückenersatz (HBS) anhand etablierter Synthesestrategien, die im Folgenden allgemein erläutert werden.

5.1.1 Synthese Fmoc-geschützter Bausteine

Die Generierung α -methylierter, Kohlenwasserstoffverbrückungen erfordert den Einbau von α -Alkenyl- α -methyl-funktionalisierten Aminosäurebausteinen. Für die Darstellung optisch aktiver α -Aminosäuren existiert eine Reihe verschiedener Synthesestrategien, wie asymmetrische Strecker-Reaktionen oder die asymmetrische Hydrierung von α,β -Dehydro- α -aminosäurederivaten.²²² Eine zunehmend populäre Methode basiert auf der Alkylierung von Ni(II)-Komplexen von Aminosäure-Schiffbasen. Diese Strategie zeichnet sich durch ein breites Substratspektrum, einfache präparative Handhabung, gute Skalierbarkeit und leichten Zugang zu α -methylierten Derivaten aus und wurde daher für die Bausteinsynthese ausgewählt.^{223–225} Die Darstellung des häufig genutzten α -methylierten Bausteins Fmoc-S₅-OH (**32**) erfolgte aufbauend auf literaturbekannten Syntheseprotokollen^{226,227} und verlief über die Alkylierung des chiralen Ni(II)-Komplexes einer Alanin-Schiffbase (Abbildung 13). Für die Synthese des Komplexes wurde in einem ersten Schritt L-Prolin (**33**) mit Benzylchlorid unter basischen Bedingungen *N*-alkyliert. Die anschließende Aktivierung des Benzylprolins (**34**) zum Säurechlorid mittels Thionylchlorid und Amidierung mit dem vergleichsweise gering nukleophilen 2-Aminobenzophenon lieferte (*S*)-2-[*N*-(*N'*-Benzylpropyl)aminobenzophenon (**35**). Die Reaktion verlief zunächst nur mit geringer Ausbeute, konnte jedoch entsprechend eines von Ueki et al. optimierten Protokolls²²⁷ durch den Wechsel zu Mesylchlorid als Aktivierungsreagenz und der Zugabe von *N*-Methylimidazol erheblich gesteigert

werden. Die folgende Umsetzung mit racemischem Alanin und Nickel(II)-nitrat unter basischen Bedingungen lieferte schließlich Komplex **36**.²²⁷ Die folgende Deprotonierung der α -Alanylposition und Alkylierung mittels 5-Bromopent-1-en lieferte Komplex **37** mit exzellenter Diastereoselektivität. Nach saurer Zersetzung von **37** konnte das chirale Auxiliar **35** regeneriert und die α -Alkenyl- α -methylaminosäure mit *N*-Fmoc-Succinimid (Fmoc-OSu) zum Baustein **32** umgesetzt werden.

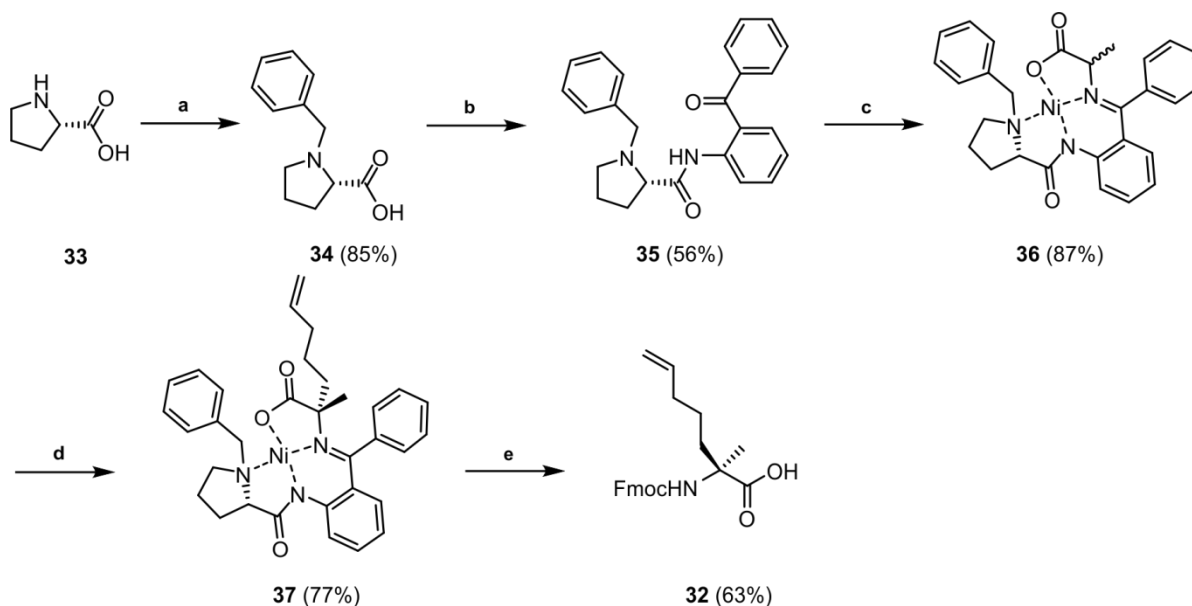


Abbildung 13. Synthese eines α -Alkenyl- α -methyl-Bausteins Fmoc-S₅-OH (**32**) zur Generierung α -methylierter, Kohlenwasserstoffverbrückungen. **a)** NaOMe, BnCl, MeOH, 50° C, 60h; **b)** 1. *N*-Methylimidazol, Mesylchlorid, DCM, 0° C, 2. 2-Aminobenzophenon, Reflux, 20h . **c)** 1. D/L-Alanin, Ni(NO₃)₂, MeOH, 50° C, 30 min 2. KOH, reflux, 1.5h. **d)** 5-Bromopent-1-en, KOH, 0° C bis RT, 2h. **e)** 1. HCl_{aq}, MeOH, Reflux, 2. Fmoc-OSu, NaCO₃, Dioxan/Wasser, 7d.

5.1.2 Synthese α -helikal stabilisierter Peptide mit α -methylierter, Kohlenwasserstoffverbrückungen

Die α -helikal stabilisierten Peptide wurden als C-terminale Carboxamide unter Standard-Fmoc-Bedingungen an NovaSyn-TGR-Harz aufgebaut. Bei der Synthese der kohlenwasserstoffverbrückten Peptide erfolgte der Einbau der dargestellten bzw. kommerziell verfügbaren α -methylierten Aminosäuren sowie die Kupplung der jeweils folgenden Bausteine mit Hilfe des Kupplungsreagenzes COMU,²²⁸ um bei den sterisch anspruchsvolleren Kupplungen vollständigen Umsatz zu erreichen. Die Ringschlussmetathese verlief quantitativ direkt an der Festphase unter Schutzgasatmosphäre und Verwendung des Grubbs-I-Katalysators.⁸⁴

Abschließend wurden die Peptide für die Affinitätsbestimmung *N*-terminal funktionalisiert und von der Festphase abgespalten (Abbildung 14).

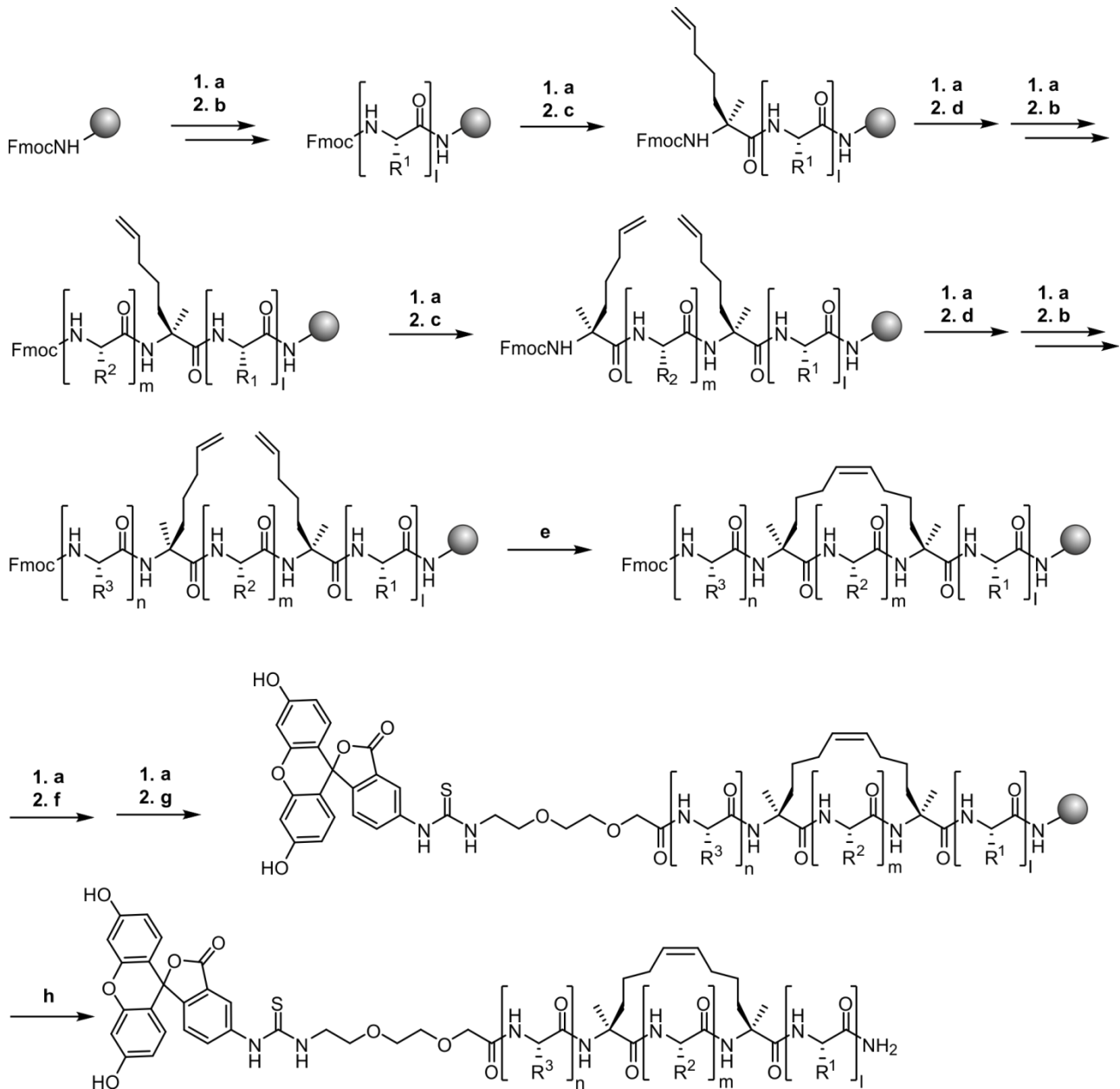


Abbildung 14. Synthese der α -methylierten, kohlenwasserstoffverbrückten Derivate. a) *Fmoc*-Entschützung: Piperidin(20%), DMF , RT, 2 \times 5min; b) *Fmoc*-AS-OH, HCTU, DIEA, DMF, RT, 2 \times 60min; c) **32**, COMU, Oxyma, DIEA, DMF, RT, 1 \times 60min; d) *Fmoc*-AS-OH, COMU, Oxyma, DIEA, DMF, RT, 1 \times 60min; e) Grubbs-I, DCE, Argon-Atmosphäre, RT, 3 \times 2h; f) *Fmoc*-O2Oc-OH, HCTU, DIEA, DMF, RT, 2 \times 60min; g) *Fluoreszenzmarkierung*: FITC, DIEA, DMF, 12h; h) *Abspaltung*: TFA, TIPS, H₂O, RT, 3 \times 2h.

5.1.3 Synthese α -helikal stabilisierter Peptide mit Wasserstoffbrückenersatz

Das mittels HBS-Strategie stabilisierte Derivat wurde entsprechend der von Aurora und Mitarbeitern entwickelten Methode erhalten,⁶⁴ wobei die abschließende Markierung mit Fluorescein an der Seitenkette eines C-terminal ergänzten Lysin-Restes erfolgte (Abbildung 15). Im Gegensatz zur Makrozyklisierung der α -methylierten Kohlenwasserstoffverbrückungen erforderte die Ringschlussmetathese des N-terminalen Wasserstoffbrückenersatzes die Anwendung harscher Reaktionsbedingungen und verlief erst unter Einsatz von Hoveyda-Grubbs II-Katalysator und Mikrowellenbestrahlung quantitativ.

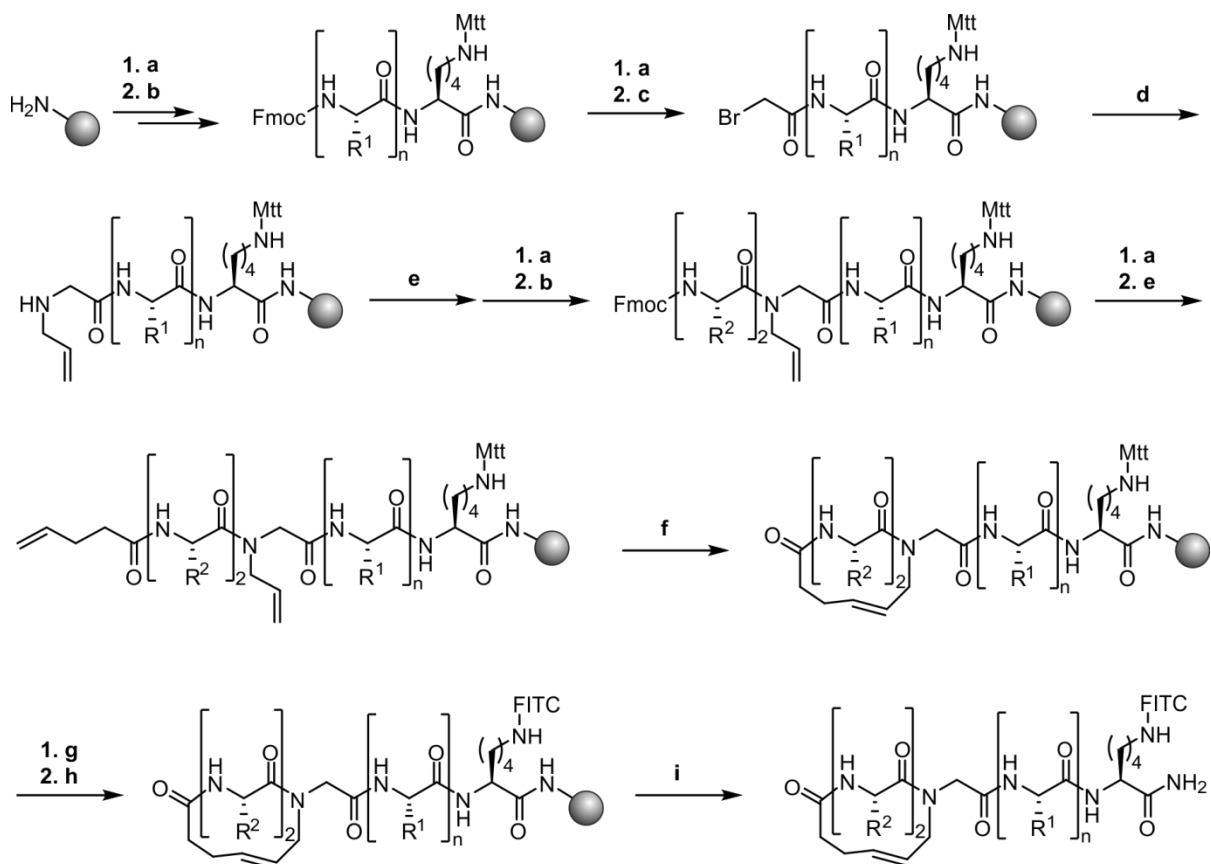


Abbildung 15. Synthese der mittels Wasserstoffbrückenersatz stabilisierten SOS Peptidsequenz. a) *Fmoc-Entschützung*: Piperidin(20%), DMF, RT, 2 × 5min; b) Fmoc-AS-OH, HCTU, DIEA, DMF, RT, 2 × 60min; c) Bromoessigsäure, DIC, DIEA, DMF, RT, 2 × 60min; d) Allylamin, DMF, RT, 1h; e) Fmoc-AS-OH, COMU, Oxyma, DIEA, DMF, RT, 2 × 60min; f) 4-Pentensäure, HCTU, DIEA, DMF, RT, 2 × 60min; g) Hoveyda-Grubbs-II, DMF, Argon-Atmosphäre, μ w, 120° C 2 × 10min; h) Fmoc-O2Oc-OH, HCTU, DIEA, DMF, RT, 2 × 60min; i) *Abspaltung*: TFA, TIPS, H₂O, RT, 3 × 2h.

5.2 Adressierung der Ras-Aktivität mittels stabilisierter Peptid-Sekundärstrukturen

5.2.1 Adressierung von Ras–Effektor-Wechselwirkungen mit stabilisierten β -Haarnadel-Peptiden

Strukturelle Analyse von Ras–Effektor-Komplexen

Ausgehend von den Bindungsepitopen verschiedener Ras-Effektoren wurden konformativ stabilisierte Peptide generiert, die potentiell als orthosterische Inhibitoren von Ras–Effektor-Wechselwirkungen eingesetzt werden können. In einem ersten Schritt wurden dazu alle verfügbaren Strukturdaten von Ras–Effektor-Komplexen nach α -Helices oder β -Strängen untersucht, die als Startpunkt für die Synthese Peptid-basierter Inhibitoren genutzt werden können. Insgesamt sind in der Proteindatenbank Strukturdaten von Ras gebunden an sechs verschiedene Effektoren verfügbar (Tabelle 1 und Abbildung 16).¹⁴³

Tabelle 1. Übersicht über Ras–Effektor-Wechselwirkungen für deren Interaktionen Strukturdaten verfügbar sind. (RBD = Ras-bindende Domäne, RA = Ras-assoziierte Domäne)

GTPase	Effektor	Fragment	Quelle	Nukleotid	Auflösung	PDB	Referenz
H-Ras	Byr2 (Raf)	RBD	Hefe	GppNHp	3.0Å	1K8R	Scheffzek ²²⁹
H-Ras	c-Raf	RBD	huma	GppNHp	2.5Å	4G0N	Fetics ²³⁰
H-Ras	c-Raf ^{A85K}	RBD	Mensch	GppNHp	2.2 Å	3KUD	Flichtinski ²³¹
Rap1A	c-Raf	RBD	Mensch	GppNHp	2.2Å	1C1Y	Nassar ²³²
Rap1A	c-Raf	RBD	Mensch	GppNHp	2.0Å	1GUA	Nassar ²³³
H-Ras ^{G12V}	GRB14	RA	Mensch	GTP	2.4Å	4K81	Qamra ²³⁴
H-Ras	PI3Ky	volle Länge	Mensch	GppNHp	3.0Å	1HE8	Pacold ²³⁵
H-Ras	PLC ϵ 1-1	RA-2	Mensch	GTP	1.9Å	2C5L	Bunney ²³⁶
H-Ras	RalGDS	RA	Ratte	GppNHp	2.1Å	1LFD	Huang ²³⁷
H-Ras	Nore1	RA	Maus	GppNHp	1.8 Å	3DDC	Stieglitz ²³⁸

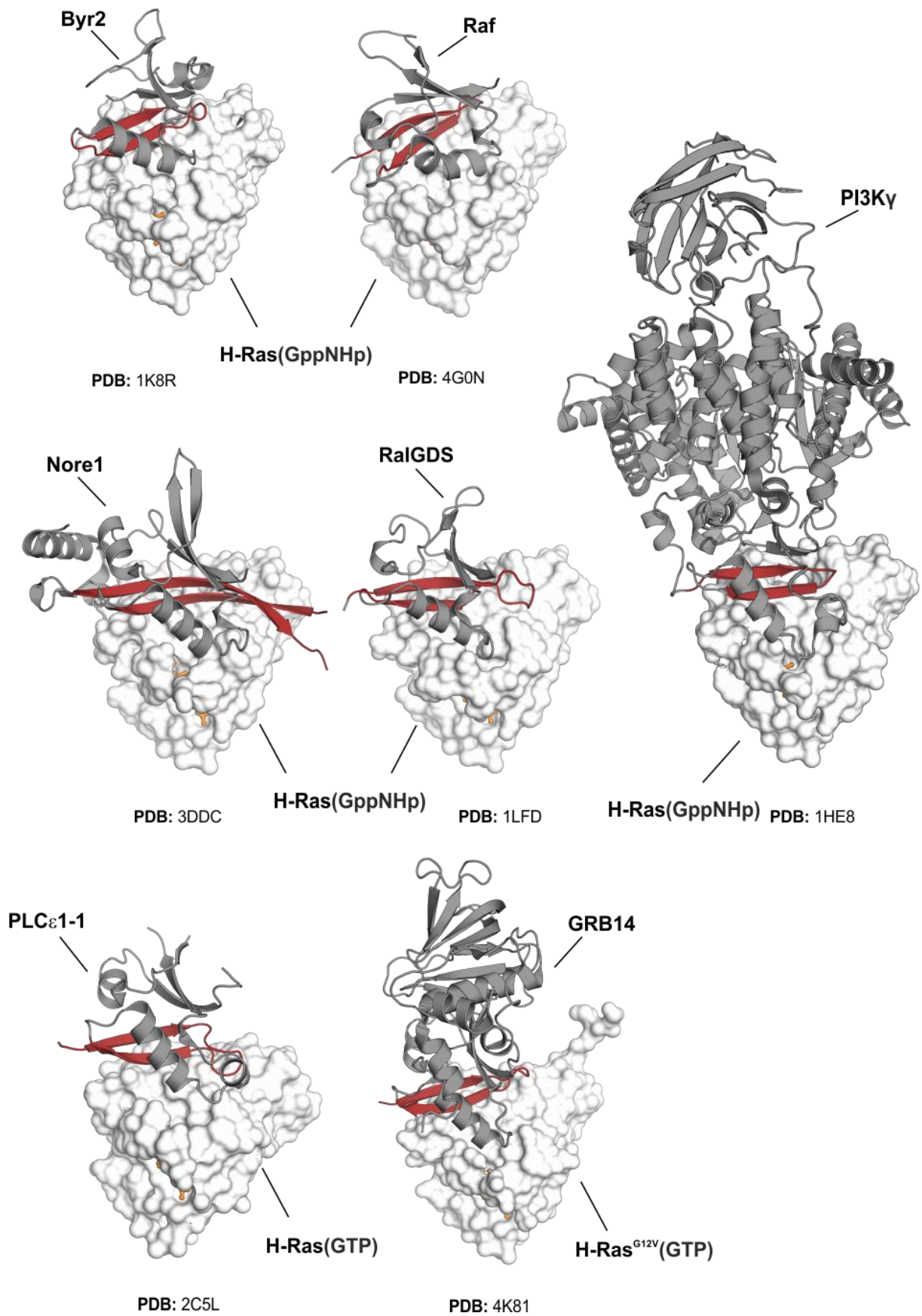


Abbildung 16. Übersicht über Kristallstrukturen von Ras-Effektor-Wechselwirkungen. Die konservierte Interaktion eines antiparallelen β -Faltblatts des Effektors (grau) mit dem β 2-Faltblatt von Ras (weiß) ist jeweils rot hervorgehoben. (Byr2 ist ein Raf-Homolog aus Hefe)

Trotz teils deutlicher Unterschiede auf der Ebene der Proteinsequenz, offenbarte ein Vergleich der Kristallstrukturen Gemeinsamkeiten auf struktureller Ebene.¹⁴³ Ein Vergleich der in der PDB verfügbaren Ras-Effektor-Komplexe zeigte, dass ein Teil der Bindung über ein anti-paralleles β -Faltblatt des Effektors vermittelt wird, das in allen Fällen bis auf Nore1 durch eine Kehre zu einer β -Haarnadel geschlossen ist (Abbildung 17). Zusammen mit dem Ras β 2-Faltblatt wird ein intermolekulares β -Faltblatt gebildet. Dabei zeigten computergestützte Untersuchungen von Ras-Raf-Komplexen, dass Reste, die einen wesentlichen Teil zur Bindungsenergie beitragen („hot spots“), im Bereich I36 - Y40 des Ras β 2-Faltblatts liegen.¹⁵

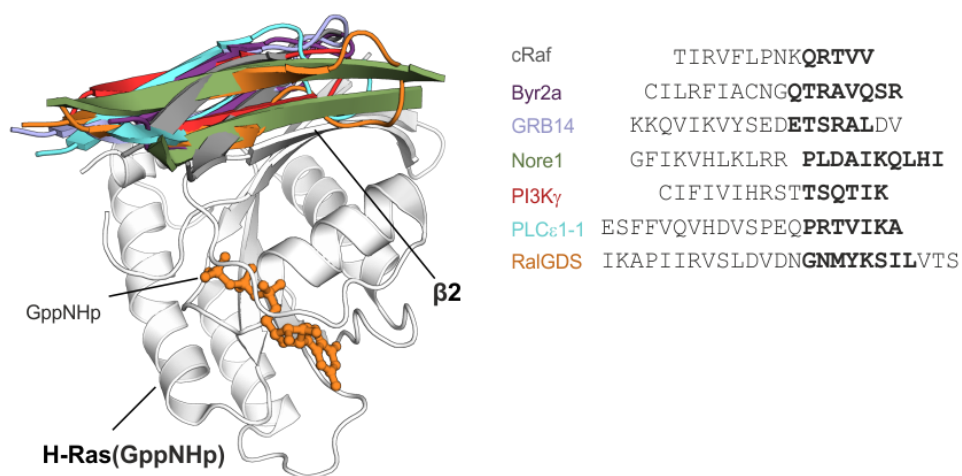


Abbildung 17. Wechselwirkung verschiedener Effektoren an das β 2-Faltblatt von Ras. Die Strukturen der verschiedenen β -Faltblätter wurden in der Software PyMol auf die Struktur der Raf-Ras-Interaktion überlagert. Zudem wurden die zugehörigen Peptidsequenzen mit Hilfe der Software ClustalW2 überlagert. Die mit Ras interagierenden Reste sind dabei fett hervorgehoben.

Bei einem Vergleich literaturbekannter Affinitäten der verschiedenen Ras-assoziierten (RAs) und Ras-bindenden Domänen (RBDs) zeigten sich allerdings deutliche Unterschiede. Während sich die Affinitäten der meisten Effektoren im niedrigen mikromolaren bis hohem submikromolaren Bereich befinden, zeichnet sich die Interaktion mit c-Raf durch niedrig nanomolare Affinitäten aus und wurde daher für eine eingehendere Analyse ausgewählt (Tabelle 2).²³⁹

Tabelle 2. Affinitäten Ras assoziierender (RA) und Ras-bindender Domänen (RBDs) verschiedener Effektorproteine gebunden zu Ras(GppNHp).

	c-Raf ²⁴⁰	GRB14 ²³⁴	Nore1 ²⁴⁰	PI3K γ ²³⁵	Plc1 ϵ 1 ²⁴⁰	RalGDS ²⁴⁰
Reste	53-131	106-356	199-358	217-309	2133-2246	789-885
GTPase	H-Ras	H-Ras G12V	H-Ras	N-Ras	H-Ras	H-Ras
K_D (Methode)	0.08 μ M (ITC)	3.6 μ M (SPR)	0.32 μ M (ITC)	2.9 μ M (ITC)	0.82 μ M (ITC)	1.0 μ M (ITC)

Eine Übersicht über die verschiedenen Kontaktstellen zwischen H-Ras und der c-Raf-RBD gibt Abbildung 17 (PDB 4G0N). Das β 1- und β 2-Faltblatt der c-Raf-RBD sind über eine α -Kehre zu einer β -Haarnadel verbunden. Diese Haarnadel bindet über mehrere Rückgrat- und Seitenketteninteraktionen an das β 2-Faltblatt von H-Ras und bildet ein erweitertes intermolekulares, antiparalleles β -Faltblatt. Neben den Rückgrat-Interaktionen der Raf-Reste Lys65, Asn67 und Val67, bildet Gln66 eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Amid-Funktion des Rückgrats von Ras Arg41 aus und stabilisiert gleichzeitig mit einer weiteren Wasserstoffbrückenbindung die α -Schleife durch intramolekulare Wechselwirkung mit dem Rückgrat-Carbonylsauerstoff von Raf Pro63. Zudem bilden Arg67 von Raf β 2 sowie Arg59 von Raf β 1 eine Salzbrücke mit Glu37 in der Switch I-Region von Ras. Des Weiteren interagiert Raf Val69 mittels van-der-Waals-Bindung mit Ile36 in der Ras Switch I-Region (Abbildung 18 und Abbildung 19A).

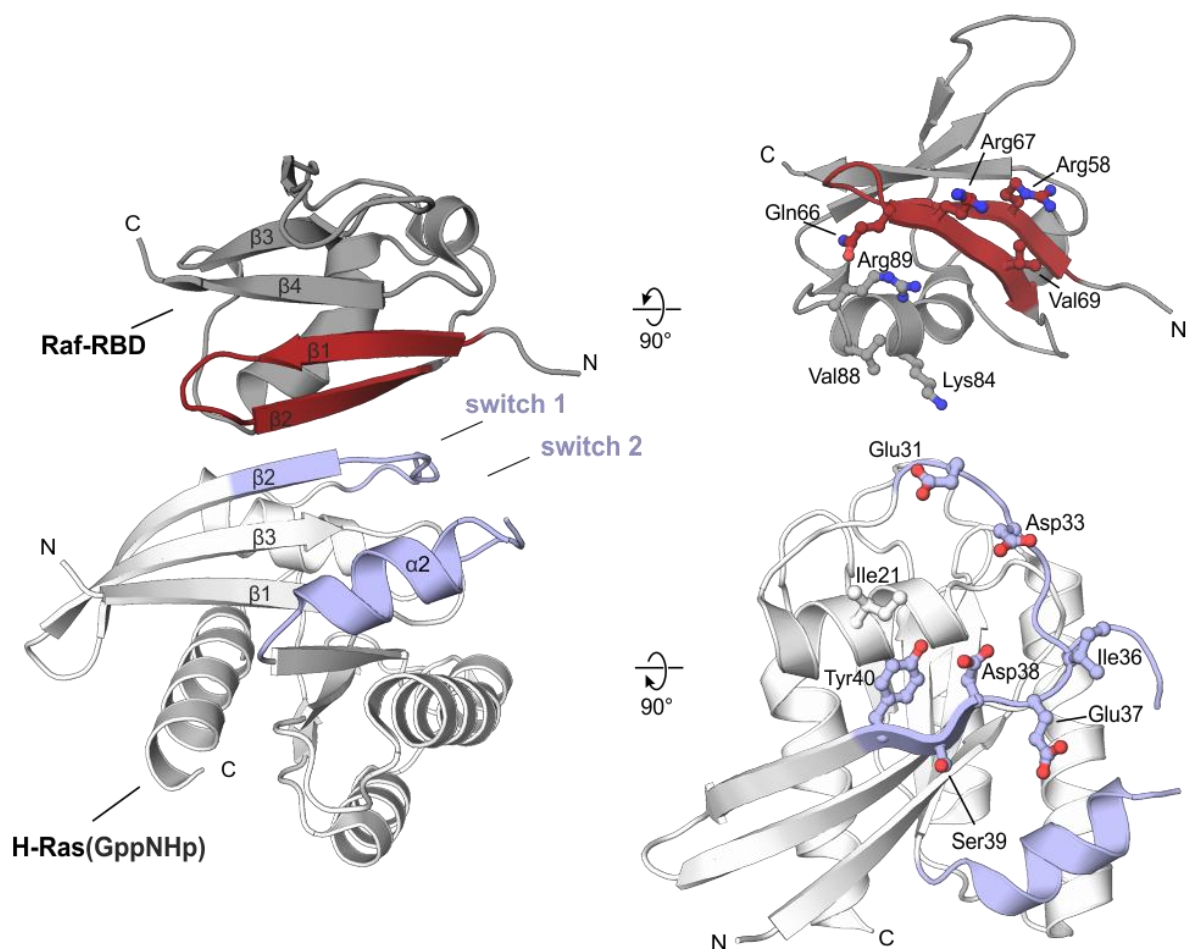


Abbildung 18. Wechselwirkungen der c-Raf-RBD mit H-Ras(GppNHp) (PDB 4G0N). Die Switch 1- und Switch 2-Region von H-Ras (blau) und die β 1/2-Haarnadel von Raf (rot) sind farblich hervorgehoben. Interagierende Reste beider Proteine sind explizit gezeigt.

Neben den Wechselwirkungen der β -Faltblätter bestehen im Ras–Raf-RBD-Komplex Kontaktpunkte zwischen Resten der Raf-RBD α 1-Helix (Lys84, Val88 und Arg89) zur Switch I-Region von Ras, die einen wichtigen Beitrag zur Gesamt-Affinität des Komplexes leisten.²³⁰ Insbesondere die R89L Mutante der Raf-RBD zeigt zu H-Ras nur noch eine Affinität im hohen mikromolaren Bereich.^{233,241} Diese Reste sind strukturell allerdings so weit von der c-Raf β -Haarnadel entfernt, dass sie nicht in die Synthese stabilisierter Peptide einbezogen werden können²³⁰

Synthese und Evaluierung makrozyklischer β -Faltblatt-Peptide aus Effektor-Domänen

Die Synthese der Peptide erfolgte auf Basis der c-Raf β 1/ β 2-Haarnadel (Thr57 - Val72), die alle genannten Schlüsselinteraktionen sowie die α -Kehre (Pro61 - Asn66) enthält, welche möglicherweise zur Vororientierung des Peptids beitragen und die Zyklisierung erleichtern könnte (Abbildung 19A). Wie in Kapitel 2.2 dargelegt, wurden für die Synthese stabilisierter β -Faltblätter eine Reihe verschiedener Strategien und deren Kombination beschrieben. Um das Vorhandensein der α -Schleife der Wildtyp-Peptidsequenz zu nutzen und das komplexe Netzwerk aus inter- und intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen der Ras–c-Raf-RBD-Wechselwirkung zu erhalten, sollte die Peptidsequenz terminal zu einem Makrozyklus geschlossen werden. Dazu wurde die Peptidsequenz C-terminal um einen an der γ -Carboxy-Funktion Allyl-geschützten Asparaginsäurerest und N-terminal um einen an der ϵ - Amino-Funktion Mtt-geschützten Lysinrest erweitert. Eine der beiden Amino-Funktionen des N-terminalen Lysins wurde dabei jeweils für den Ringschluss genutzt, während die verbliebene Amino-Funktion zur Einbringung einer Fluoreszenzmarkierung diente. Durch diese Seitenketten-zu-Seitenketten-Verknüpfung (*side chain-to-side chain*) bzw. N-Terminus-zu-Seitenketten-Verknüpfung (*head-to-side chain*) konnten rasch zwei verschieden lange Verbrückungen getestet werden. Außerdem wurde noch der Ringschluss über ein rigides D-Pro-L-Pro-Dipeptidtemplat untersucht. Um die relativ lange Sequenz zusätzlich zu stabilisieren, wurden außerdem Derivate mit weiteren intramolekularen Disulfid- und Alken-Verbrückungen synthetisiert. Dazu wurden entsprechend funktionalisierte Aminosäuren an den Positionen Val60 und Thr68 in die Peptidsequenz eingebaut, deren Seitenketten nicht in die Interaktion mit Ras oder die intramolekulare Stabilisierung der Haarnadel involviert sind (Abbildung 19B).

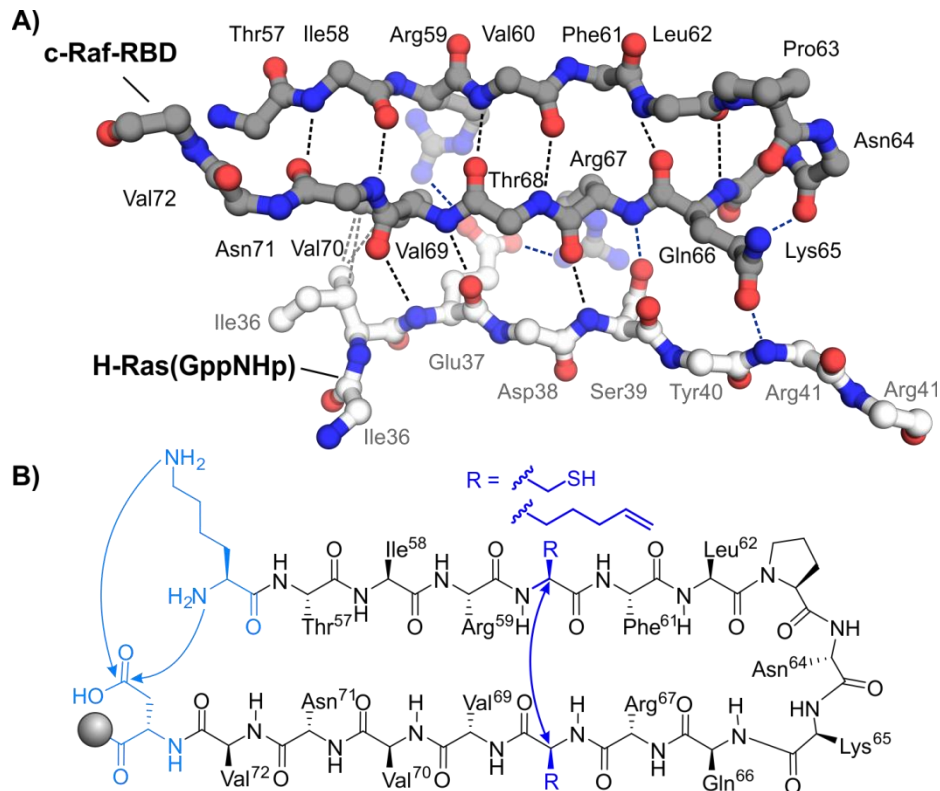


Abbildung 19. Planung konformativ stabilisierter Derivate des antiparallelen c-Raf-RBD $\beta 1/\beta 2$ -Faltblatts. a) Ausschnitt der Kristallstruktur des H-Ras-c-Raf-RBD-Komplexes (PDB 4G0N) mit dem H-Ras $\alpha 2$ -Faltblatt (weiß) und dem Raf $\beta 1/\beta 2$ -Faltblatt (grau). Wechselwirkung der Rückgrate sowie interagierende Reste sind explizit dargestellt. b) Strukturformel des antiparallelen c-Raf-RBD $\beta 1/\beta 2$ -Faltblatts und geplante Makrozyklisierungen.

Die Synthese der linearen Peptide erfolgte an NovaSyn-TGR-Harz unter Verwendung von Standard-Fmoc-Festphasenbedingungen. Die Seitenketten-zu-Seitenketten-Verknüpfung bzw. *N*-Terminus-zu-Seitenketten-Verknüpfung der Peptide wurde nach Entfernen der orthogonalen Schutzgruppen direkt an der Festphase unter Einsatz des Kupplungsreagenz PyBOP (Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat) durchgeführt. Generell zeichnen sich Peptidzyklisierungen an der Festphase im Vergleich zur Zyklisierung in Lösung durch zumeist kürzere Reaktionszeiten und verminderte Bildung von Multimeren aus.²⁴² Der Einsatz von PyBOP sollte eine Guanylierung der freien Aminogruppe verhindern, was eine mögliche Nebenreaktion bei einem Überschuss von Ammoniumsalz- bzw. Uroniumsalz-basierten Kupplungsreagenzien darstellt.^{242,243} Die Zyklisierungsreaktionen verliefen für die Peptide **38** – **41** (Abbildung 20) quantitativ und racemisierungsfrei bei einer vergleichsweise kurzen Reaktionszeit von 1 - 2h, was möglicherweise auch auf eine Vororientierung des Peptids durch das bereits vorhandene zentrale α -Kehrenmotiv zurückzuführen ist.²⁴⁴

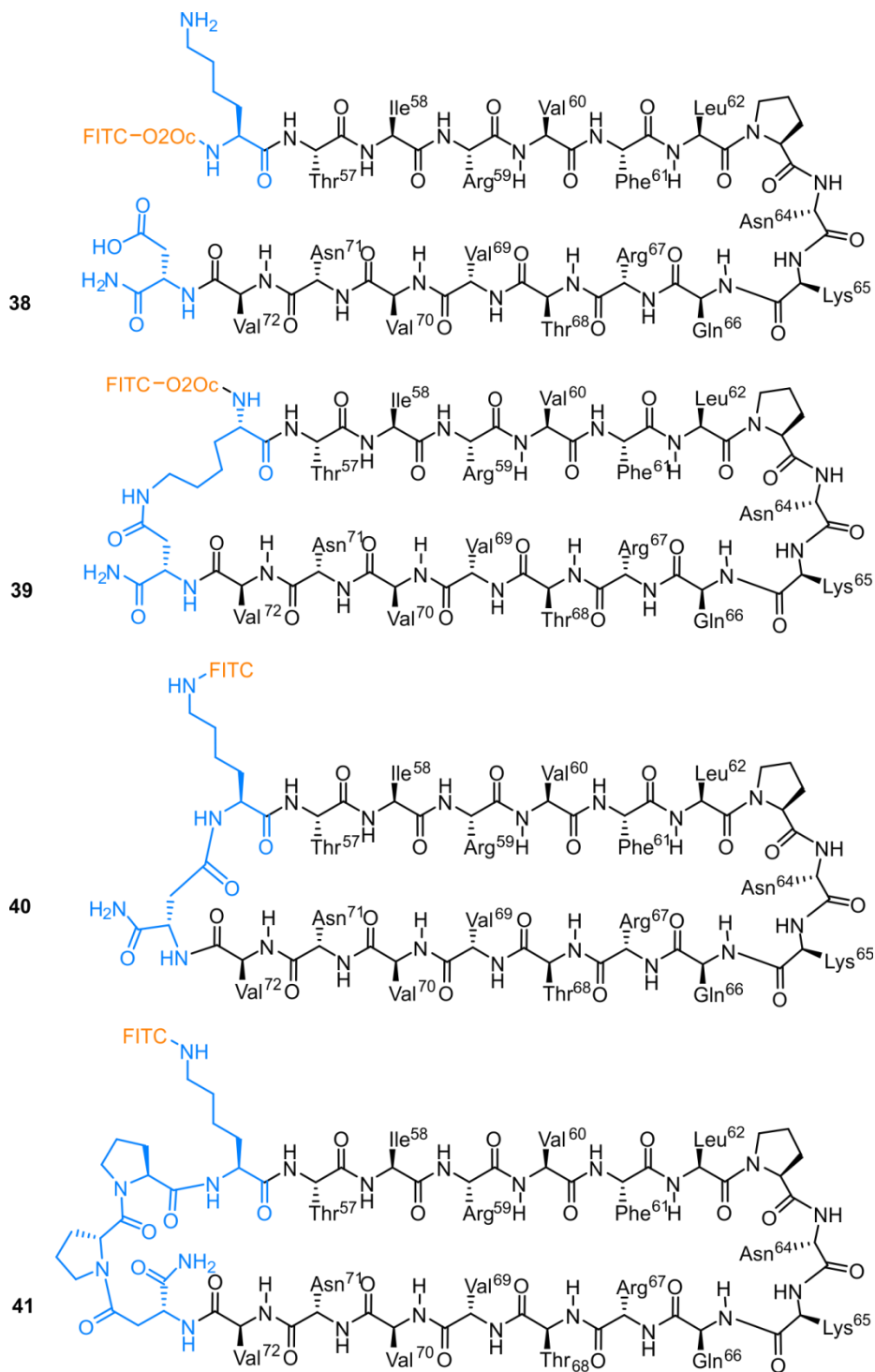


Abbildung 20. Strukturen der terminal zyklisierten Derivate der c-Raf-RBD β 1/2-Haarnadel.

Die intramolekulare Verbrückung der Peptide erfolgte durch Bildung eines Disulfids zweier in die Sequenz eingebrachter Cystein-Reste (Abbildung 21A). In der Literatur sind dafür eine Reihe verschiedener Methoden beschrieben, die in Lösung oder an der Festphase unter Verwendung verschiedener Oxidationsmittel, wie Luftsauerstoff und Dimethylsulfoxid oder stärkeren Oxidationsmitteln, wie Wasserstoffperoxid oder Iod, verlaufen.²⁴⁵

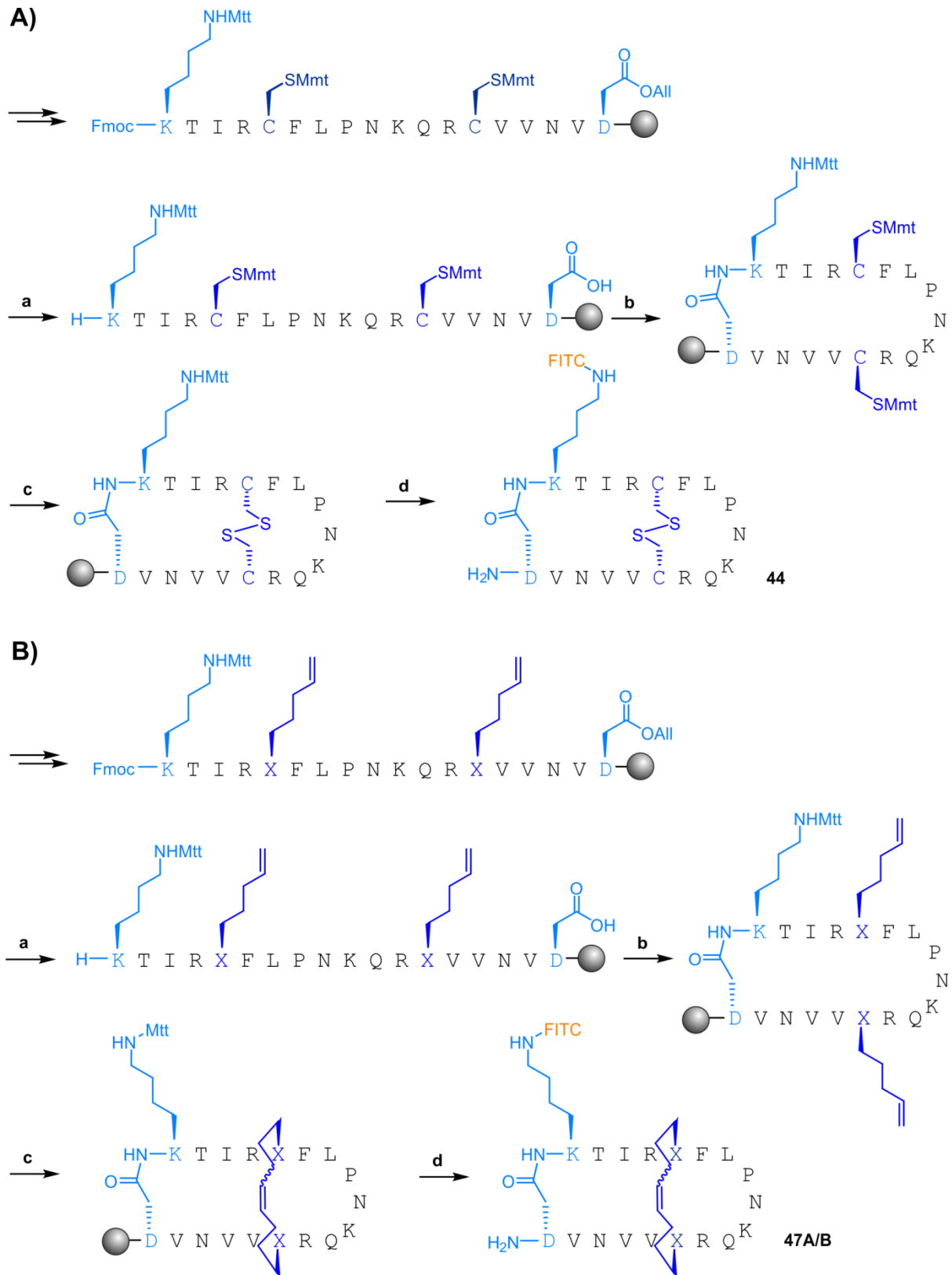


Abbildung 21. Exemplarisches Syntheseschema der von der c-Raf-RBD β 1/2-Haarnadel abgeleiteten stabilisierten Peptide. A) *N*-Terminus-zu-Seitenketten-Zyklisierung und Einbau einer Disulfid-Verbrückung: a) 1. $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$, PhSiH_3 , THF, 2×20 min, RT; 2. Piperidin(20%), DMF, RT, 2×5 min. b) PyBOP, DIEA, DMF, 1 h, RT. c) 1. 1% TFA/DCM, 2×20 min, RT; 2. NCS, DMF, 15 min. d) 1. FITC, DIEA, DMF, 12 h; 2. TFA, TIPS, H_2O , RT, 3×2 h. B) *N*-Terminus-zu-Seitenketten-Zyklisierung und Einbau einer Alkenverbrückung: a) 1. $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$, PhSiH_3 , THF, 2×20 min, RT; 2. Piperidin(20%), DMF, RT, 2×5 min. b) PyBOP, DIEA, DMF, 1 h, RT. c) [Grubbs-I], DCE, 3×2 h, RT. d) 1. 1% TFA/DCM, 2×20 min, RT; 2. FITC, DIEA, DMF, 12 h; 3. TFA, TIPS, H_2O , RT, 3×2 h.

Kürzlich wurde der Einsatz von *N*-Chlorsuccinimid (NCS) beschrieben, der eine rasche und effiziente Oxidation direkt an der Festphase erlaubt.²⁴⁶ Nach Synthese des linearen Peptids konnten die 4-Methoxytriyl(Mmt)-Schutzgruppen der Cystein-Reste orthogonal mit 1%-iger TFA-Lösung entfernt und die freien Thiol-Gruppen durch Umsetzen mit NCS oxidiert werden. Während die Bildung des Disulfids im Falle des offenen und des *N*-Terminus-zu-Seitenketten-verknüpften Peptids **44** mit einem moderaten Überschuss an NCS (1.5 eq) bei kurzer Reaktionszeit (10 min) erfolgte, war das Disulfid im Falle des Seitenketten-zu-Seitenketten-verknüpften Peptids synthetisch nicht zugänglich. Bei vorausgehender Seitenketten-zu-Seitenketten-Makrozyklisierung unterblieb die Bildung des Disulfids auch bei stark ausgedehnten Reaktionszeiten und deutlich höheren Überschüssen an NCS. Wurde hingegen zunächst die Disulfidbrücke gebildet, konnte die terminale Makrozyklisierung nicht geschlossen werden (Abbildung 22).

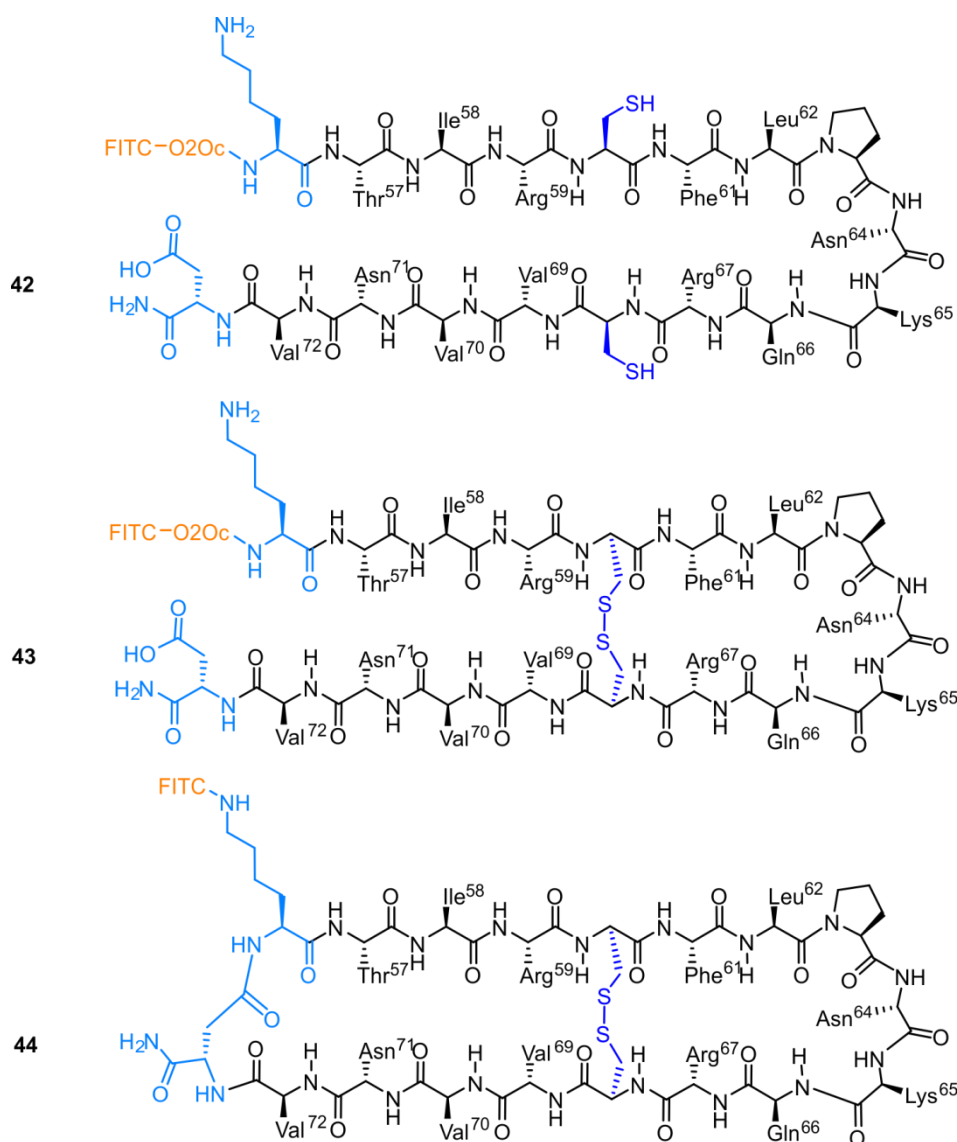


Abbildung 22. Strukturen der mittels Disulfidbrücke stabilisierten Derivate der c-Raf-RBD β 1/2-Haarnadel.

Neben der Disulfid-Brücke wurde die Ringschlussmetathese zweier α -Alkenylaminosäuren untersucht. Dazu wurden zwei Fmoc-(*S*)-Aminohept-6-ensäure-Bausteine in die Sequenz eingebracht und direkt an der Festphase unter Verwendung von Grubbs-I-Katalysator durch Ringschlussalkenmetathese verknüpft (Abbildung 21B). Im Gegensatz zur Synthese kohlenwasserstoffverbrückter Peptide kamen keine α -methylierten Bausteine zum Einsatz, da die α -Methylgruppe die Ausbildung helikaler Konformationen begünstigt.⁵³ Anhand von HPLC-MS Analytik war die Bildung von *cis*-/*trans*-Isomeren zu beobachten, die einzeln für die Affinitätsbestimmung isoliert wurden (**46A/B** und **47A/B**). Bei der Synthese der bicyklischen Verbindungen war wie bereits bei den Disulfid-verbrückten Derivaten wiederum nur die Variante des *N*-Terminus-zu-Seitenketten-verknüpften Peptids synthetisch zugänglich, was auf ungünstige sterische Verhältnisse im Fall der Seitenketten-zu-Seitenketten-Verknüpfung hindeutet (Abbildung 23).

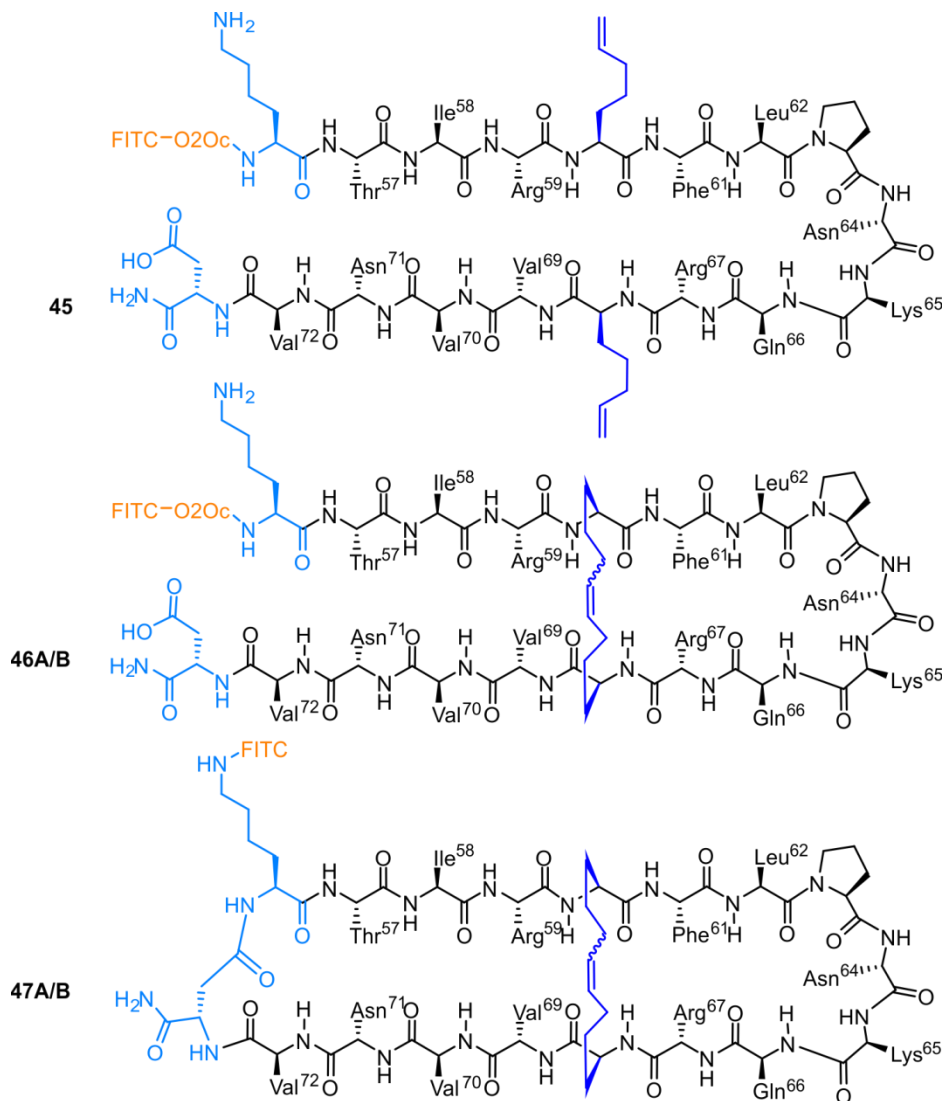


Abbildung 23. Strukturen der mittels Alkenverbrückung stabilisierten Derivate der c-Raf-RBD β 1/2-Haarnadel. Im Fall von Peptid **46** und **47** wurden bei der Ringschlussmetathese *cis*-/*trans*-Isomere erhalten.

In Anlehnung an die von Robinson und Mitarbeitern³⁶ beschriebenen Inhibitoren der p53–HDM2-Wechselwirkung (Abschnitt 2.2) wurde zudem noch ein D-Pro-L-Pro-Templat in das kürzere Fragment Ile58 -Val70 integriert und das Rückgrat zyklisiert, um rigidere Derivate mit geringer konformativer Freiheit zu generieren (Peptide **48** und **49**). Für die Einbringung einer Fluoreszenzmarkierung wurden die Positionen Val60 bzw. Phe61 gewählt, die beide nicht an der Interaktion mit Ras bzw. der intramolekularen Stabilisierung des Faltblatts beteiligt sind. Diese Reste wurden durch Lysin ersetzt und nach selektiver Entschützung mit FITC ligiert. Im Fall Rückgrat-zyklisierter Peptide kann die Synthese der linearen Sequenz prinzipiell an jeder Position gestartet werden. Jedoch kann eine Vororientierung des Makrozyklus durch das Vorhandensein von Kehren-Strukturen die Effizienz der folgenden Zyklisierungsreaktion deutlich steigern.²⁴⁴

Obwohl sowohl die α -Kehre als auch das D-Pro-L-Pro-Templat prinzipiell zur Vororientierung des Peptids beitragen können, wurde die Sequenz innerhalb der α -Kehre gestartet, um die sterisch anspruchsvolle Rückgrat-Zyklisierung auf die sekundäre Amino-Funktion von Prolin zu vermeiden. Dazu wurde die Seitenkette eines Allyl-geschützten Aspartat-Bausteins über die Seitenkette an NovaSyn-TGR-Harz immobilisiert, die nach Abspalten vom polymeren Träger die Amid-Funktion des Asn64-Rests bildet. Nach dem Aufbau der linearen Sequenz und Entfernung der orthogonalen Schutzgruppe gelang die Makrozyklisierung unter Verwendung von PyBOP direkt an der festen Phase (Abbildung 24).

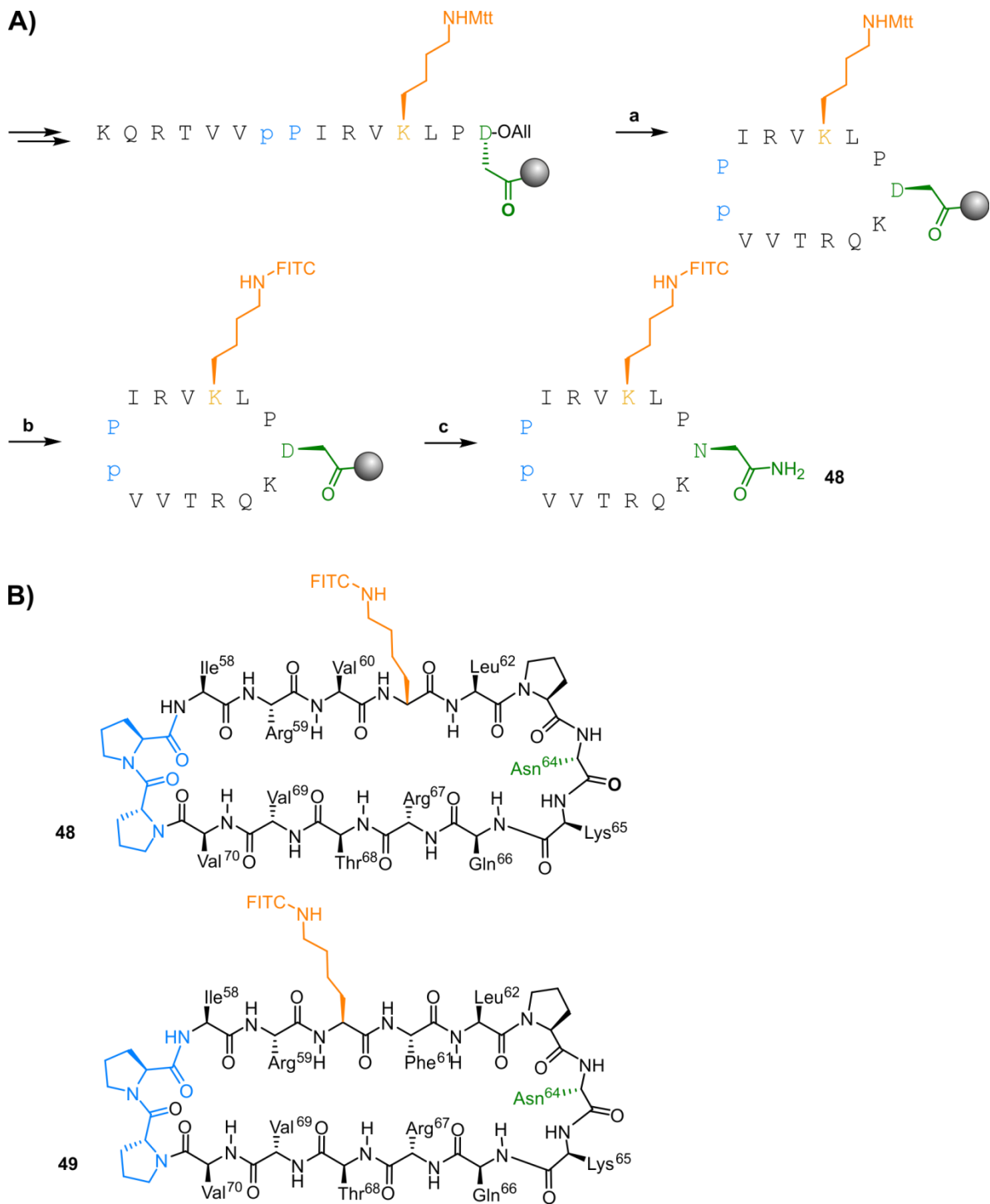


Abbildung 24. Synthese der mittels D-Pro-L-Pro-Dipeptidtemplat stabilisierten Derivate der c-Raf-RBD β 1/2-Haarnadel. A) Repräsentative Syntheseroute: a) *Fmoc-Entschützung*: Piperidin(20%), DMF, RT, 2 \times 5min; b) Fmoc-AS-OH, HCTU, DIEA, DMF, RT, 2 \times 60min; c) Bromoessigsäure, DIC, DIEA, DMF, RT, 2 \times 60min; d) Allylamin, DMF, RT, 1h; e) Fmoc-AS-OH, COMU, Oxyma, DIEA, DMF, RT, 2 \times 60min; f) 4-Pentensäure, HCTU, DIEA, DMF, RT, 2 \times 60min; B) Strukturformeln der beiden stabilisierten Derivate.

Alle zyklisierten Peptide wurden abschließend mit Fluorescein ligiert und dann in einem FP-Bindungsexperiment auf ihre Affinität zu H-Ras₁₋₁₈₈ in allen drei Nukleotidbindungszuständen getestet (Abbildung 25).

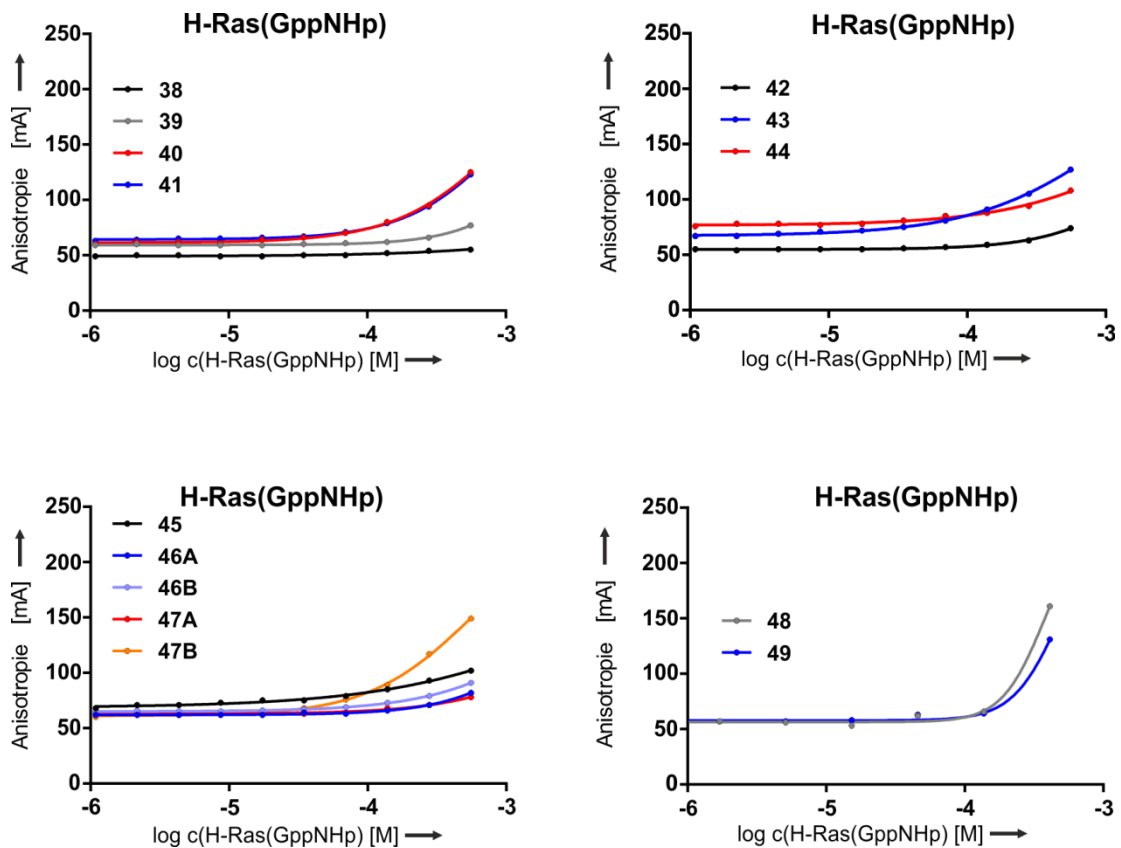


Abbildung 25. Ergebnisse des Fluoreszenzpolarisationsbindungsexperiments der stabilisierten Derivate der c-Raf-RBD $\beta 1/2$ -Haarnadel mit H-Ras(GppNHp). Im Gegensatz zur Wildtyp-Peptidsequenz **38** sind teils deutliche Verbesserungen zu erkennen. Jedoch zeigen alle Peptide eine $K_D > 500 \mu\text{M}$. ($c_{\text{max.}}[\text{H-Ras(GppNHp)}] = 550 \mu\text{M}$; $N = 1$).

Dazu wurde H-Ras₁₋₁₈₈ rekombinant in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Ras-Proteine liegen aufgrund ihrer GTP-Hydrolyseaktivität nach ihrer Aufreinigung vornehmlich in der GDP-gebundenen Form vor. Daher wurde GDP entsprechend etablierter Protokolle unter Verwendung von alkalischer Phosphatase entfernt und durch das nicht-hydrolysierbare GTP-Analogon 5'-Guanylylimidodiphosphat (GppNHp) ersetzt.²⁴⁷ Bei H-Ras(GppNHp) war für die modifizierten Derivate im Vergleich zu den jeweiligen Wildtyp-Peptiden teils ein deutlich stärkerer Anstieg der Fluoreszenzanisotropie zu erkennen, wobei zwischen den verschiedenen Stabilisierungsarchitekturen deutliche Unterschiede bestehen. Zudem zeigten die Peptide eine deutliche Präferenz für die GppNHp-gebundene Form auf, was darauf hindeutet, dass die Peptide bei ausreichender Affinität möglicherweise selektiv Ras in seiner aktivierten Form adressieren könnten. Allerdings wurden auch für die Derivate durchweg hohe Dissoziationskonstanten ($K_D > 500 \mu\text{M}$) beobachtet. Auch wenn in der Literatur Beispiele existieren, bei denen durch eine nachfolgende Sequenzoptimierung deutliche Affinitätsgewinne erzielt werden konnten,³⁶ wäre die Affinität der resultierenden Derivate noch immer um Größenordnungen geringer als die des

Ausgangsproteins (Tabelle 2), sodass die Peptide nicht für weitergehende Untersuchungen genutzt wurden.

Zwar deuten die FP-Experimente auf eine erhöhte Affinität der konformativ stabilisierten Peptide hin, resultieren jedoch nicht in ausreichend guten Bindern, die als Startpunkt für eine weitere Optimierung dienen könnten. Auf der Suche nach einem besseren Startpunkt wäre möglicherweise eine Strategie notwendig, die von einer kombinatorischen Bibliothek stabilisierter Peptidstrukturen ausgeht. Nach Abschluss dieser Studien wurden kürzlich derartige Inhibitoren für Ras–Effektor-Wechselwirkungen beschrieben, die ausgehend von einer Bibliothek zyklischer Peptide sukzessive optimiert wurden und bei moderater Zellgängigkeit dazu in der Lage sind, die Signalwirkung von Ras *in cellulo* zu unterdrücken.^{188,248,249}

5.2.2 Adressierung von Ras–GEF-Interaktionen

Strukturelle Analyse Ras–GEF-Komplexen

Ausgehend von den Bindungsepitopen verschiedener Ras-GEFs sollten konformativ stabilisierte Peptide generiert werden, die als orthosterische Inhibitoren von Ras–GEF-Wechselwirkungen eingesetzt werden können. Analog zur Synthese der von Ras-Effektoren abgeleiteten Peptide wurden in einem ersten Schritt alle verfügbaren Strukturdaten verschiedener Ras–GEF-Komplexe untersucht, um Peptidsequenzen aus α -Helices oder β -Sheets zu identifizieren, die als Startpunkt für die Synthese Peptid-basierter Inhibitoren genutzt werden können. Im Falle der Ras–SOS-Wechselwirkung existieren in der Proteindatenbank (*protein data base*, PDB)²⁵⁰ vier verschiedene Kristallstrukturen (PDB-Code 1NVU, 1NVV, 1NVW, 1NVX). Darin enthalten die Einheitszellen jeweils zwei Ras- und ein SOS1-Molekül (von jetzt an kurz SOS), wobei sich die Proteine und Nukleotidbindungszustände teils unterscheiden. Lediglich die Kristallstruktur 1NVW enthält Ras in seiner Wildtyp-Form. Die Strukturen 1NVU und 1NVX weisen dagegen die Ras-Mutation A59G abseits der Wechselwirkungsfläche und 1NVV die Ras-Mutation Y62A in direkter Nähe zur Wechselwirkungsfläche auf, sodass 1NVW als Grundlage weiterer Untersuchungen gewählt wurde. In diesem Komplex bindet die katalytische Einheit von SOS (SOS_{kat.}) an zwei H-Ras-Moleküle in unterschiedlichen Nukleotidbindungszuständen.¹⁴² Das aktive Zentrum von SOS (SOS_{akt.}) interagiert darin mit nukleotidfreiem H-Ras, während H-Ras(GppNHp) an einer davon abgelegenen Position an SOS bindet (SOS_{allost.}), um die katalytische Domäne allosterisch zu stabilisieren

(Abbildung 26). In beiden Fällen wird die Bindung von SOS über mehrere Kontaktstellen in Kehrenstrukturen sowie über Reste aus α -helikalen SOS-Peptidsequenzen vermittelt. Um die Eignung dieser helikalen Sequenzen als Startstrukturen für einen Stabilisierungsansatz abzuschätzen, wurde die jeweilige Wechselwirkungsfläche mit H-Ras und der prozentuale Anteil an der gesamten Interaktionsfläche berechnet. Dazu wurden mit Hilfe der Software MSMS (*Maximal Speed Molecular Surface*)²⁵¹ die lösungsmittelzugänglichen Oberflächen der Proteinkomplexe und der isolierten Bindungspartner bzw. Peptidfragmente berechnet und zueinander in Relation gesetzt. Diese Berechnungen ergaben, dass die meisten α -helikalen Sequenzen von SOS nur jeweils einen geringen Anteil der Wechselwirkungsfläche mit den beiden Ras-Proteinen ausmachen ($< 300 \text{ \AA}^2$ und damit weniger als 20% der jeweiligen Interaktionsfläche). Die einzige Ausnahme stellt dabei die α H-Helix aus SOS_{kat} (Phe929-Gln944) mit einer Wechselwirkungsfläche von 611 \AA^2 und einem Anteil von ca. 40% dar, die auch kürzlich von Patgiri *et al.* für die Synthese orthosterischer Ras–SOS-Inhibitoren genutzt wurde.⁶⁴ Die α H-Helix sowie die von Patgiri *et al.* auf Löslichkeit optimierte Peptidsequenz wurden daher als Startpunkt für weitergehende Untersuchung ausgewählt (Abbildung 26).

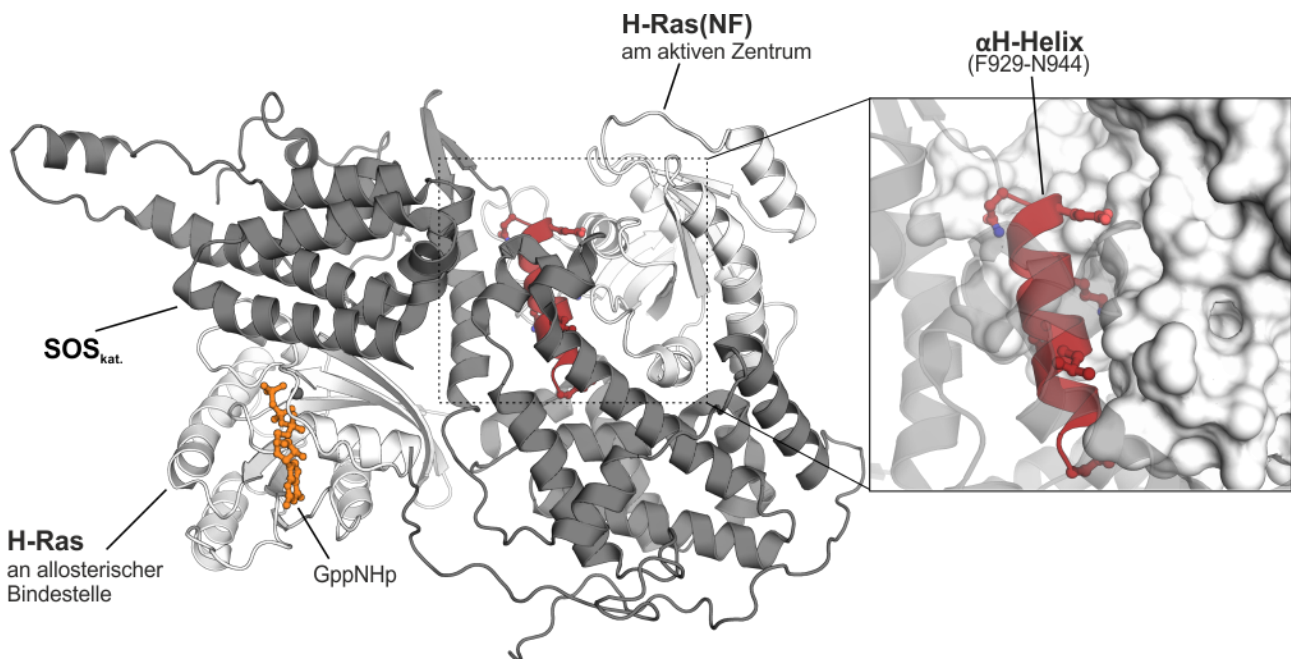


Abbildung 26. Die Ras–SOS-Wechselwirkung. (PDB-Code 1NVW). Die katalytische Untereinheit von SOS1 gebunden an nukleotidfreies H-Ras am aktiven Zentrum, sowie H-Ras(GppNHp) als allosterischer Aktivator der Nukleotidaustauschreaktion. Die Vergrößerung zeigt nukleotidfreies (NF) H-Ras in Oberflächendarstellung und die α H-Helix der katalytischen Einheit von SOS1 in Cartoon-Darstellung (rot). Die interagierenden Seitenketten der Helix sind explizit dargestellt.

Abseits der Kristallstrukturen der Ras-SOS-Interaktion waren keine anderen Strukturinformationen für weitere Ras-GEFs verfügbar. Allerdings wurde in einer anderen Studie ein Homologiemodell der H-Ras-RasGRF1-Wechselwirkung entwickelt und für die Synthese Peptid-basierter Inhibitoren genutzt.²⁵² Anhand dieses Modells ließ sich eine weitere potentiell α -helikale Sequenz ableiten, die ebenfalls als Ausgangspunkt für eine konformative Stabilisierung genutzt werden könnte (Abbildung 27).

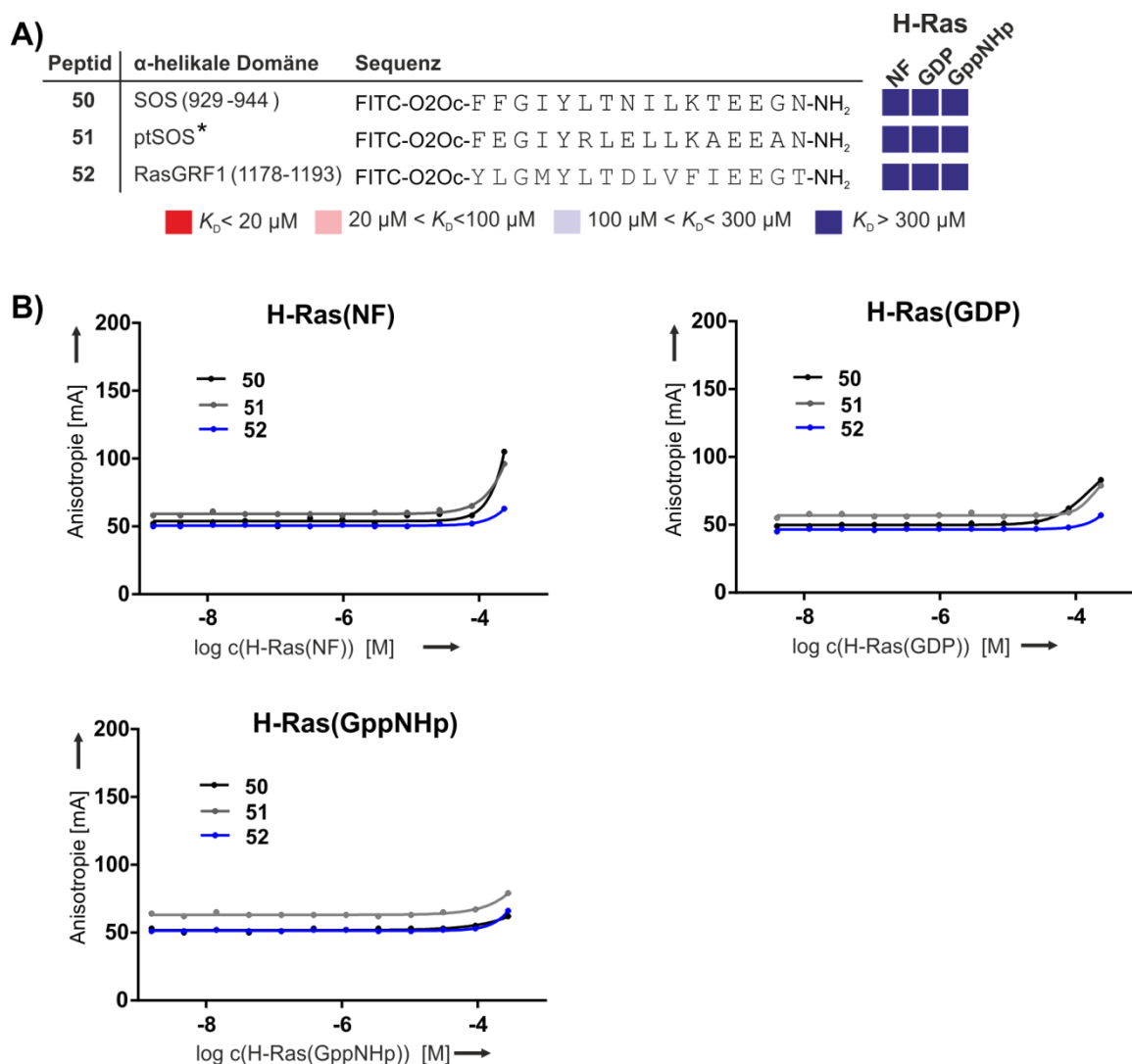


Abbildung 27. Evaluierung des Bindungsverhaltens der aus Ras-GEFs abgeleiteten Peptidsequenzen. A) Synthetisierte Peptidsequenzen und Bindungsdaten mit H-Ras in verschiedenen Nucleotidbindungszuständen. (* von Patgiri et al.⁶⁴ auf Löslichkeit optimierte Peptidsequenz) B) Repräsentative Daten der Fluoreszenzpolarisierungsexperimente (N = 1). (Maximale Proteinkonzentrationen: H-Ras(NF) = 300 μM , H-Ras(NF) = 300 μM und H-Ras(NF) = 250 μM).

Design und Evaluierung α -helikal stabilisierter Ras-GEF-Peptide

Um die beste Startsequenz für diesen Stabilisierungsansatz auszuwählen, wurden zunächst die Wildtypsequenz der SOS α H-Helix (**50**), die von Patgiri et al.²⁰⁵ auf Löslichkeit optimierte Sequenz (**51**) sowie die anhand des Homologiemodells²⁵² abgeleitete Sequenz aus RasGRF1 (**52**) auf ihre Affinität zu Ras in verschiedenen Nukleotidbindungszuständen getestet. Dazu wurden die drei Peptide an Rinkamid-Harz mittels Fmoc-basierter Festphasenpeptidsynthese (*Solid phase peptide synthesis*, SPPS) mit einem Mikrowellen-unterstützten Syntheseroboter aufgebaut und anschließend *N*-terminal mit einer Fluorescein-PEG-Einheit ligiert (Abbildung 27A). Die drei Sequenzen wurden in einem FP-Bindungsexperiment mit H-Ras in allen drei Nukleotidbindungszuständen getestet und zeigten durchweg hohe Dissoziationskonstanten ($K_D > 300 \mu\text{M}$), wobei keine Abhängigkeit der Ergebnisse vom eingesetzten Puffer oder Detergenzien beobachtet wurde. Allerdings zeigten Peptide **50** und **51** einen steileren Anstieg der Fluoreszenzanisotropie (Abbildung 27B), was unter der Annahme ähnlicher Plateauwerte auf eine höhere Affinität hindeutet. Daher wurden diese beiden Sequenzen als Startpunkte für die Synthese seitenkettenverbrückter Derivate ausgewählt.

Der Einbau der nicht-natürlichen Aminosäuren wurde auf Grundlage der Struktur des H-Ras–SOS-Komplexes geplant (Abbildung 28A). Dazu wurden diejenigen Reste identifiziert, die nicht an der Bindung zu H-Ras(NF) beteiligt sind und bei denen eine Einbringung der Seitenkettenverbrückung keine sterische Hinderung erwarten lässt. Für die gängigste Architektur, die sog. *i, i+4*-Verbrückung,⁷⁹ ergaben sich dafür jeweils drei stabilisierte Peptide (**53** – **55** und **57** – **59**). Zum Vergleich wurden zudem das Peptid **56** in der weniger gebräuchlichen *i, i+3*-Architektur, sowie ein mittels Wasserstoffbrückenersatz stabilisiertes Peptid (**60**)⁶⁴ dargestellt (Abbildung 28C).

Die stabilisierten Peptide wurden in einem Fluoreszenzpolarisationsexperiment auf ihre Affinität zu H-Ras in den unterschiedlichen Nukleotidbindungszuständen untersucht. Im Vergleich zu den Wildtyp-Sequenzen wurden zwar teils geringfügig steilere Anstiege der Fluoreszenzanisotropie beobachtet, was unter Annahme eines vergleichbaren Plateaubereichs auf gesteigerte Affinitäten hindeutet. Allerdings binden die modifizierten Peptide noch immer um ein Vielfaches schlechter als das zu inhibierende Ausgangsprotein. Interessanterweise ließen sich dabei die von Patgiri et al. beschriebenen Bindungsdaten⁶⁴ nicht reproduzieren, wobei das HBS-stabilisierte Peptid ein schlechteres Bindungsverhalten als die α -methylierten, kohlenwasserstoffverbrückten Peptide zeigte. Die Peptide adressieren die hochkonservierte G-Domäne von Ras, sodass eigentlich kein großer Unterschied im Bindungsverhalten der einzelnen Ras-Isoformen zu erwarten ist. Um

trotzdem eine Abhängigkeit der erhaltenen Ergebnisse von der eingesetzten Ras-Isoform auszuschließen, wurden die Peptide ebenfalls mit den Konstrukten N-Ras₁₋₁₈₈ und K-Ras₁₋₁₇₄ getestet. Dazu wurden die Proteine rekombinant in *E. coli* exprimiert, aufgereinigt und in die GppNHp-gebundene bzw. nukleotidfreie Form überführt. Allerdings ergab sich auch für diese beiden Isoformen ein vergleichbar negatives Ergebnis. (Abbildung 28)

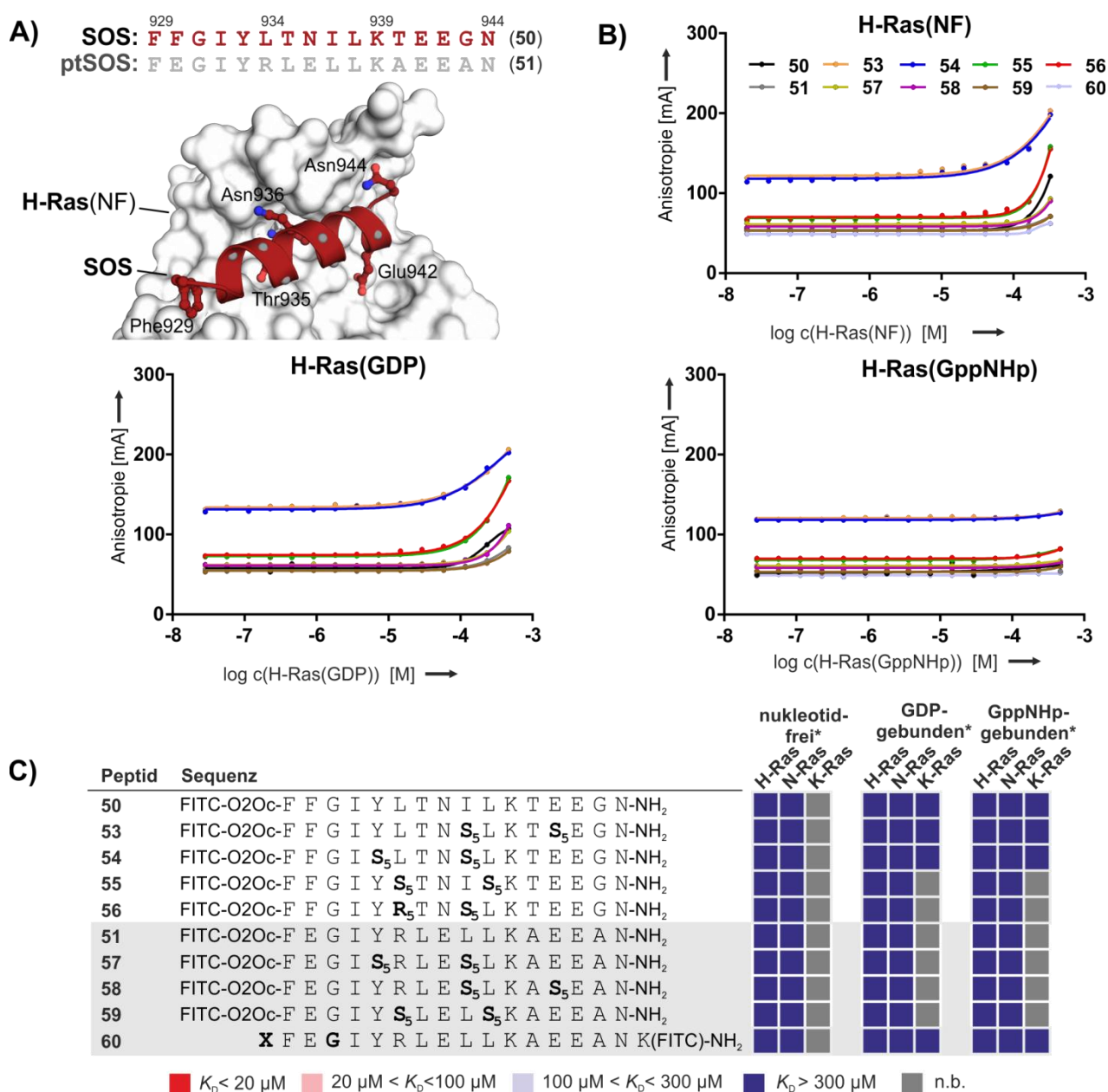


Abbildung 28. Design und Evaluierung α -methylierter, kohlenwasserstoffverbrückter Derivate der α H-Helix von SOS. A) Struktur der SOS α H-Helix (rot) gebunden an nukleotidfreies H-Ras (grau) (PDB: 1NVW) und die von Patgiri et al.⁶⁴ abgeleitete Sequenz (ptSOS). An der Bindung beteiligte Seitenketten sind explizit dargestellt, wohingegen Positionen, die für den Einbau der nicht-natürlichen Aminosäuren verfügbar sind, grau hervorgehoben wurden. B) Repräsentative Daten der Fluoreszenzpolarisierungsexperimente (N = 1). (Maximale Proteinkonzentrationen: H-Ras(NF) = 330 μM , H-Ras(GDP) = 470 μM und H-Ras(GppNHp) = 330 μM ; N-Ras(NF) = 280 μM , H-Ras(GDP) = 400 μM und H-Ras(GppNHp) = 400 μM ; K-Ras(GDP) = 50 μM und K-Ras(GppNHp) = 50 μM) C) Synthetisierte Peptidsequenzen und Ergebnis des FP-Bindungsexperiments der drei Ras-Isoformen in verschiedenen Nucleotidbindungszuständen.

Wie bereits bei den stabilisierten β -Haarnadeln deuten die Ergebnisse prinzipiell auf höhere Affinitäten der modifizierten Peptide im Vergleich zu den jeweiligen Wildtypsequenzen hin, sind jedoch für den Einsatz als PPI-Inhibitoren zu gering, was auch eine weitergehende Sequenzoptimierung als wenig erfolgversprechend erscheinen lässt. Als Technologie ist α -methylierte Kohlenwasserstoffverbrückung üblicherweise in der Lage, Affinitätsgewinne von bis zu zwei Größenordnungen zu bewirken.⁷⁹ In einigen Fällen wurden auch deutlich höhere Gewinne beobachtet, was auf zusätzliche hydrophobe Wechselwirkungen des Makrozyklus mit der Oberfläche des Zielproteins zurückzuführen war.⁷⁹ Um wirksame Modulatoren für Ras-GEF-Wechselwirkungen zu entwickeln wären daher höher affine Startpeptide oder die Generierung zusätzlicher Interaktionen notwendig. Im Falle der Ras-Proteine sind dafür jedoch derzeit keine weiteren nutzbaren Peptidsequenzen in GEFs bekannt. Auch für den umgekehrten Ansatz, der Stabilisierung eines Sekundärstrukturelements aus Ras konnten keine geeigneten Ausgangssequenzen identifiziert werden.

Nach Abschluss der vorgestellten Untersuchungen wurden kürzlich Studien veröffentlicht, die eine ähnliche Strategie verfolgen.²⁵³ Ausgehend von der α H Wildtyp-Sequenz aus SOS wurde darin anhand analoger Überlegungen ein Satz α -methylierter, kohlenwasserstoffverbrückter Peptide generiert und auf ihre Affinität zu verschiedenen K-Ras Konstrukten getestet. Dabei unterscheiden sich die beiden besten Kandidaten nur in der Gestalt der verwendeten Linkergruppe von Peptiden **35** und **36**. Für diese Peptide wurden in einem Fluoreszenzpolarisationsexperiment nanomolare Affinitäten zu K-Ras im GDP- und GppNHp-gebundenen Zustand beschrieben. Trotz intensiver Versuche konnten diese Ergebnisse des FP-Bindungsexperiments für die Peptide **35** und **36** allerdings nicht unter den beschriebenen Bedingungen reproduziert werden. Allerdings sind die beschriebenen Beobachtungen prinzipiell sehr überraschend. Selbst die gesamte katalytische Domäne von SOS zeigt nur eine Dissoziationskonstante von $K_D = 14.5\mu\text{M}$ ²⁵⁴ mit H-Ras(GDP). Die verwendete Startsequenz der α H-Helix macht aber nur ca. 40% der Ras-SOS-Wechselwirkungsfläche aus und sollte daher eine deutliche geringere Affinität besitzen. Zudem wurden, wie bereits erläutert, mit einer anderen Stabilisierungsmethode bei vergleichbaren Peptiden nur Affinitäten im hohen mikromolaren Bereich erzielt (K_D (HBS3-H-Ras) = 158 μM). Obwohl sich die Konformation der Switch I und II Regionen von K-Ras je nach Nukleotidbindungszustand ändert, wurden überraschenderweise nahezu identische Affinitäten für die GDP- und GTP-Form von K-Ras beobachtet.

5.2.3 Modulation von RasGAP Aktivität

Eine Störung des GAP-vermittelten Inaktivierungsprozess ist das Resultat der häufigsten onkogenen *Ras*-Mutationen. Sie verhindern die korrekte Bindung und Funktion von RasGAPs und bewirken dadurch eine Akkumulation von aktivierten, GTP-gebundenen Ras-Proteinen. Moleküle, die dazu in der Lage sind, die GTP-Hydrolyserate zu erhöhen, wären von großem therapeutischen Nutzen.

In Säugern existieren eine Reihe verschiedener Proteine, die GAP-Aktivität für die drei verschiedenen Ras-Isoformen aufweisen, darunter p120GAP, Neurofibromin (NF1), RASAL, Proteine der GAP1 Familie wie GAP1^{IP4BP}, und die SynGAP-Familie wie SynGAP oder DAB2IP.¹¹⁶ Davon sind allerdings lediglich für den Komplex von H-Ras und der katalytischen Domäne von p120GAP (PDB. 1WQ1) strukturelle Daten verfügbar.¹⁴⁹ Die p120GAP Domäne besteht aus zahlreichen α -Helices verbunden über diverse Schleifenmotive. Dabei befindet sich der für die Katalyse entscheidende Arginin-Finger (Arg789) in einer ausgedehnten Schleife, die keine geordnete Rückgratstruktur erkennen lässt und somit für einen Stabilisierungsansatz ungeeignet ist (Abbildung 29A). Aus Mangel an geeigneten Startstrukturen wurde daher die Suche auf Komplexe von RapGAPs ausgedehnt. Rap-GTPasen sind die nächsten Verwandten der Ras-Proteine, wobei Rap1 über 50% Sequenzidentität mit Ras aufweist. Ras- und Rap-GTPasen teilen einige Effektoren und GAPs, die dazu in der Lage sind, mit Mitgliedern beider Proteinfamilien zu interagieren.²⁵⁵ In Bezug auf den GTP-Hydrolysemechanismus unterscheiden sich Rap-Proteine durch einen Threonin-Rest (Thr61) in der Switch II-Region, der nicht die katalytische Funktion des Gln61 von Ras ausüben kann. Es existieren einige GAP-Proteine mit breiter Substratspezifität (z.B. SynGAP oder GAP1), die sowohl Ras- als auch Rap-Proteine deaktivieren können, sowie Rap-spezifische GAPs.²⁵⁶ Erstere besitzen eine konventionelle RasGAP-Domäne, während letztere einen abweichenden Katalysemechanismus aufweisen. Die einzige verfügbare Komplexstruktur eines RapGAPs ist die Kristallstruktur des Rap-spezifischen Rap1GAPs gebunden an Rap1 (PDB. 3BRW). Darin ragt das Asn290 von Rap1GAP („Asparagin-Daumen“) in die Nukleotidbindetasche von Rap1 und übernimmt die Rolle des nicht vorhandenen Gln61-Rests. Zudem trägt Tyr32 der Rap1 Switch I-Region zur Stabilisierung der negativen Ladung des Übergangszustands (Abbildung 29B) bei.²⁵⁷ Im Gegensatz zu RasGAP befindet sich das katalytisch aktive Asn290 am C-terminalen Ende einer α -Helix (Q280-D291). Rap1GAP zeigt selbst zwar keine GAP-Aktivität bei Ras-Proteinen, jedoch könnte ein stabilisiertes Peptid, das in direkter Nähe der Nukleotidbindetasche an Ras bindet,

möglicherweise durch Substitution des Asn-Daumens zu einem Moleküle mit RasGAP-Aktivität umgewandelt werden.

Daher wurden analog zu den von der SOS α H-Helix abgeleiteten Peptiden, ausgehend von dieser Peptidsequenz, vier mittels α -methylierter Kohlenwasserstoffverbrückung stabilisierte Peptide in der $i, i+4$ -Architektur dargestellt. Die Peptide wurden *N*-terminal mit Fluorescein markiert und in einem FP-Experiment auf ihre Bindung zu H-Ras(GppNHp) getestet (Abbildung 29C). Leider zeigten die Peptide keinerlei nennenswerte Affinität ($K_D > 500 \mu\text{M}$). Lediglich für Peptid **63** war ein geringer Anstieg in der Anisotropie zu erkennen.

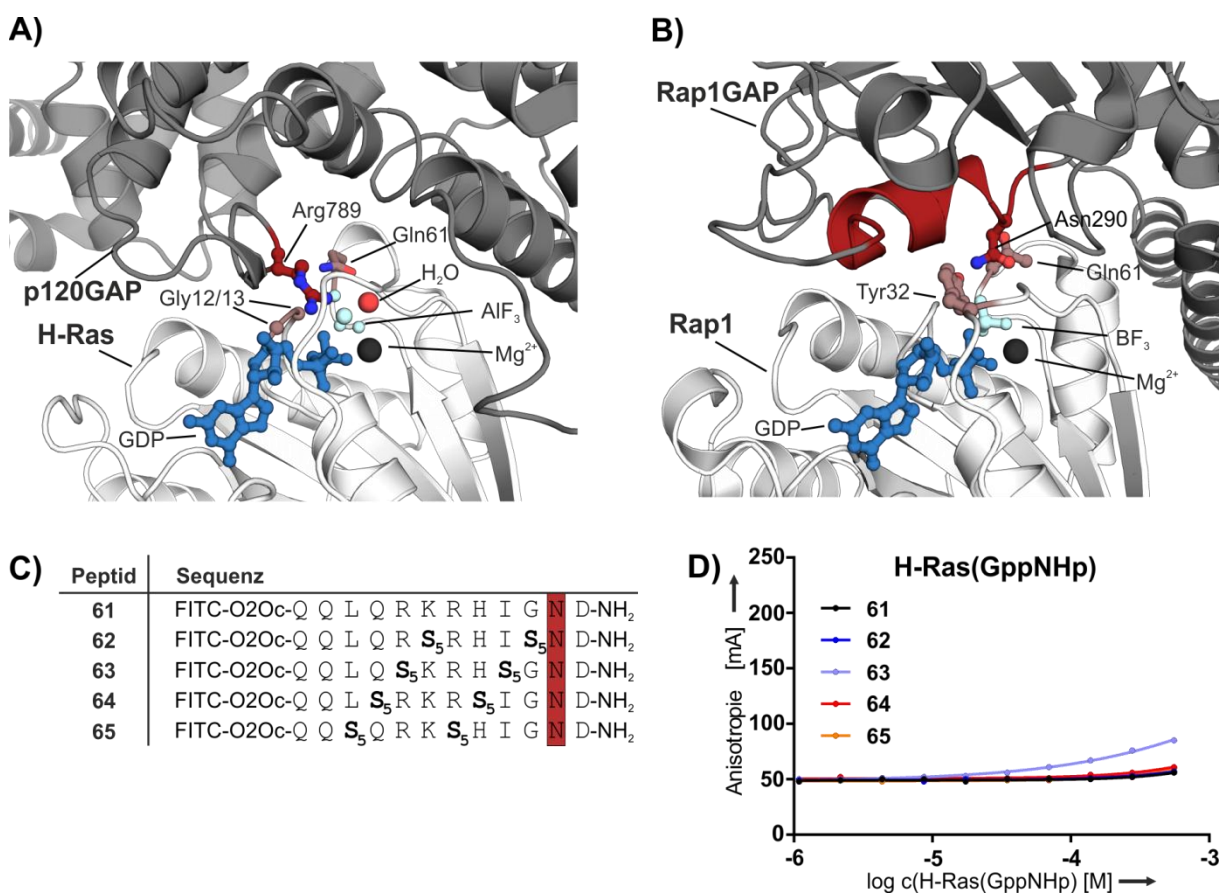


Abbildung 29. GAP-Komplexe als Ausgangspunkte für die Generierung artifizeller RasGAP-Aktivität. A) Struktur des H-Ras-p120GAP-Komplexes (PDB. 1WQ1). Der für die GTP-Hydrolyse entscheidenden Arginin-Finger (Arg789) und Gln61 aus Ras sind explizit dargestellt. Die häufig mutierten Positionen Gly12 und Gly13 sind markiert. B) Struktur des Rap1-Rap1GAP-Komplexes (PDB. 3BRW). Der für die GTP-Hydrolyse entscheidende Asparagin-Daumen (Asn290) und Tyr32 aus Ras, sowie das bei der Hydrolyse nicht involvierte Gln61 sind explizit dargestellt. Die als Ausgangspunkt für die Synthese konformativ stabilisierter Peptide genutzte α -Helix (Q280-D291) aus Rap1GAP ist rot markiert. C) Von der Rap1 α -Helix (Q280-D291) abgeleitete Peptidsequenzen. Der katalytisch wirksame Asn-Rest ist rot markiert. D) Ergebnis des FP-Bindungsexperiments mit H-Ras(GppNHp). ($c_{\text{max.}}[\text{H-Ras(GppNHp)}] = 550 \mu\text{M}$).

5.3 Modulation der Rab-Aktivität mittels stabilisierter Peptid-Sekundärstrukturen

(Diese Studie wurden in Zusammenarbeit mit M.Sc. P. M. Cromm durchgeführt. Die Proteinexpression und Aufreinigung erfolgte in Kooperation mit Frau Nathalie Bleimling und der Dortmund Protein Facility)

Die Synthese von Ras-Modulatoren auf Basis stabilisierter Sekundärstrukturelemente von natürlichen Bindungspartnern lieferte Peptide, deren Affinitäten zu niedrig waren, als dass sie als Inhibitoren entsprechender PPIs in Frage kommen. Dies war in den untersuchten Fällen jedoch vornehmlich auf die geringe Auswahl an möglichen Startsequenzen und deren niedrige Affinitäten zurückzuführen. Nichtsdestoweniger zeigte sich dabei das Potential dieses Ansatzes, da einige der stabilisierten Derivate beachtliche Affinitätsgewinne gegenüber der jeweiligen Wildtyp-Sequenz aufwiesen. Daher wurde die gleiche Strategie im auf die Familie der Rab-Proteine angewendet. Für die größte Unterfamilie kleiner GTPasen existiert eine Vielzahl verschiedener Wechselwirkungen, die bereits strukturell und biochemisch charakterisiert sind und sich daher ausgezeichnet für eine umfassende Machbarkeitsstudie anbieten. Zudem wurden Fehlfunktionen von Rab-Proteinen in letzter Zeit vermehrt mit verschiedenen Erkrankungen in Verbindung gebracht, wodurch Rab-GTPasen verstärkt als potentielle therapeutische Ziele an Bedeutung gewonnen haben.^{131,166} Inhibitoren von Rab-Protein-Wechselwirkungen können somit als Werkzeuge für die Untersuchung verschiedener biologischer Fragestellungen, sowie als Ausgangspunkt für die Medikamententwicklung dienen.

5.3.1 Strukturelle Analyse von Rab-Protein-Wechselwirkungen

Auf der Suche nach Peptidsequenzen, die für die Synthese stabilisierter Sekundärstrukturelemente aus Bindungsdomänen geeignet sind, wurden die, in der PDB zugänglichen, Proteinkomplexe von humanen Rab-GTPasen gebunden an ihre Interaktionspartner untersucht. Im Gegensatz zur Ras-Familie, bei der in vielen Wechselwirkungen ein intermolekulares β -Faltblatt involviert ist, weisen die Bindungspartner von Rab-Proteinen häufig eine oder mehrere α -Helices in ihrer Bindungsdomäne auf.^{143,152} Oftmals bestehen die Wechselwirkungsflächen dabei zum großen Teil oder sogar vollständig aus Helix-Kehre-Helix- oder Doppelwendel (*coiled-coil*)-Motiven. Daher

wurden im Folgenden stabilisierte α -helikale Peptide als neuartige Bindungspartner von Rab-GTPasen und als potentielle PPI-Inhibitoren untersucht. Um aus den zahlreichen α -helikalen Peptidsequenzen die vielversprechendsten Startstrukturen auszuwählen, wurde erneut deren Wechselwirkungsflächen mit Hilfe der Software MSMS (*Maximal Speed Molecular Surface*)²⁵¹ berechnet und zur Gesamtoberfläche in Relation gesetzt (Tabelle 3).

5.3.2 Evaluation der Wildtyp-Peptide

Anschließend wurden Sequenzen selektiert, die eine Interaktionsfläche von mindestens 600 Å² und einen hohen Anteil an der gesamten Bindungsoberfläche aufwiesen. Dabei wurden allerdings Peptide von weiteren Betrachtungen ausgeschlossen, die aus Strukturen nicht humaner Rab-Proteine bzw. Rab-Homologen abgeleitet sind. Gleiches galt für Peptidsequenzen, bei denen bereits aus literaturbekannten Studien mit Mutanten oder Proteinfragmenten eine geringe Affinität zum Zielprotein zu erwarten war (Tabelle 3). Anhand dieser Kriterien wurden die vielversprechendsten elf Kandidaten für eine weitere Untersuchung ausgewählt (Abbildung 30). Die Peptidsequenzen wurden analog zu den vorhergehenden Abschnitten an Rink Amid-MBHA-Harz unter Verwendung von Standard-Fmoc-Festphasenbedingungen mit einem Syntheseroboter synthetisiert und *N*-terminal mit einer Fluorescein-PEG-Einheit funktionalisiert (**66** – **76**, Abbildung 31). Die Mikrowellen-unterstützte Peptidsynthese führte dabei in einigen Fällen zu Aspartimidbildung, die jedoch durch Zugabe von 0.1 M HOBt während Fmoc-Entschützung unterdrückt werden konnte.²⁵⁸

5 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 3. Übersicht über die Bindungsparameter α -helikaler Peptidsequenzen aus Bindungsdomänen von Rab-Proteinen. Peptidsequenzen die für eine weiter Betrachtung ausgewählt wurden sind mit einem * markiert.

α -helikale Domäne	Sequenz	Kontaktfläche (% Gesamtinteraktion)	bekannte Zielproteine	PDB Code	Ref.
*Rab6-IP1 ₉₀₀₋₉₁₆	DDEKEQFLYHLLSFNAV	1035 Å ² (65%)	Rab6, Rab11	3CWZ	259
*LidA _{L398-S415}	LSLEMEKQLETINNLIMS	616 Å ² (17%)	Rab1, Rab8	3TNF	260
*LidA _{L427-A439}	LLHKHNGLNKLAN	998 Å ² (29%)			
*LidA _{T537-V557}	TVKKLVHHNKGLETTIHKERV	982 Å ² (29%)			
*Rabaptin5 _{V817-V830}	VQRDFVKLSQTLQV	1065 Å ² (72%)	Rab5	1TU3	261
*RILP _{F248-E269}	FEQILQERNELKAKVFLLEE	1437 Å ² (100%)	Rab7	1YHN	156
*GCC185 _{L1589-R1605}	LMEQIKLLKSEIRLER	616 Å ² (100%)	Rab6, Rab9	3BBP	262
*Rabin8 _{L189-V208}	LGQELEELTASLFEEAHKMV	1689 Å ² (75%)	Rab8	4LHY	156
*REP1 _{G378-F391}	GELPQCFCRMCAVF	760 Å ² (36%)	various Rabs	1VG9	263
*FIP2 _{L477-V498}	LEDYIDNLLVRVMEETPSILRV	810 Å ² (60%)	Rab11, Rab25	2GZD	264
*FIP3 _{N730-K755}	NFRLQDYIDRIIVAIMETNPSILEV K	870 (63%)	Rab11, Rab25	2HV8	265
Sec2 _{K99-118} ^[a]	KEVEDLTASLFDEANNMVAD	1747 (73%)	Sec4	2EQB	266
Rabex _{E351-F365}	EDGYFTNLCCAFAF	1007(42%)	Rab5, Rab21	2OT3	266
GDI _{E241-Y253} ^[a]	ELPQGFARLSAIY	887(50%)	YPT1, YPT7	3CPH	267
Drra _{Q407-R418}	QSLWGAASDYSR	945 (27%)	Rab1, Rab8	3JZA	268
Drra _{T427-S440}	TVEPGLVSAVNKMS	1098 (32%)			
TRAPP _{N32-Q50} ^[a]	NEYLILASTLHGVAIASQ	1118 (58%)	YPT1	3CUE	269
EEA1 _{A54-H65}	ADELKHYEAVH	488 (40%)	Rab5	3MJH	270
Rabphilin _{E51-R72} ^[b]	EKEIINRVIARAEMETMEQER	1260 (55%)	Rab3	1ZBD	271
Rabenosyn5 _{P460-A475} ^[c]	PLLQIHNITSFIRQA	709 (37%)	Rab4, Rab22	1ZOK	272
Rabenosyn5 _{D482-L491} ^[c]	DEVRTLQENL	652 (34%)			
Exophilin4 _{E11-R32} ^[d]	EQEAIMKVLQRDAALKRAEEER	1288 (61%)	Rab27	3BC1	273
GYP1 _{Q480-C488} ^[a]	QFAFRWMNC	637 (23%)	Rab33	2G77	165
GYP1 _{Q338-T346} ^[a]	QIEIDIPRT	586 (22%)			
GYP1 _{F597-Q605} ^[a]	FQETITFLQ	458 (17%)			
Rabex _{E351-F365} ^[e]	EDGYFTNLCCAFAF	1007(42%)	Rab5, Rab21	2OT3	266

^[a] Homolog aus *S. cerevisiae*. Aus der Literatur war bereits für Bindungspartner bekannt, dass die isolierte α -helikale Sequenz eine sehr geringe Affinität zum Zielprotein zeigt: siehe Referenzen [b]²⁷⁴, [c]²⁷², [d]²⁰⁰ und [e]²⁷⁵.

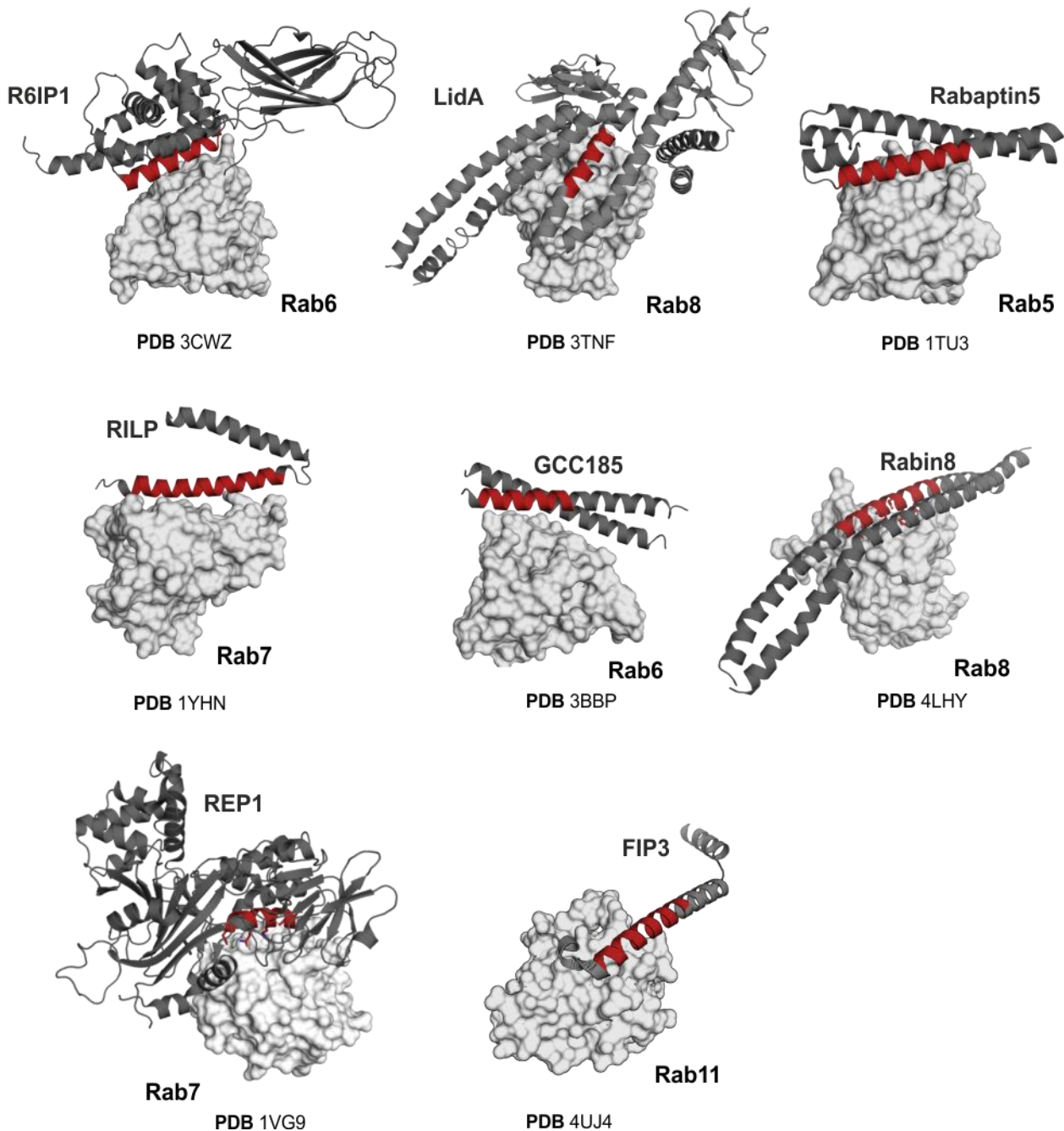


Abbildung 30. Kristallstrukturen von Rab-Protein-Komplexen mit α -helikalem Bindungsmotiv. Für eine konformative Stabilisierung geeignete, α -helikale Peptidsequenzen sind rot markiert.

Viele der Peptidsequenzen stammen aus Bindungspartnern, die mit mehreren verschiedenen Rab-GTPasen interagieren (vgl. Abschnitt 3.2). Daher wurden die Peptide in einem FP-Bindungsexperiment auf ihre Affinität zu einer Auswahl an Rab-GTPasen getestet. Zu diesem Zweck wurden Rab-Proteine mit Unterstützung der *Dortmund Protein Facility* und Frau Nathalie Bleimling in *E. coli* rekombinant exprimiert und mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Um eine verbesserte Expressionsausbeute und Proteinstabilität zu erzielen, wurden C-terminal verkürzte Konstrukte exprimiert, welche jedoch mindestens die vollständige G-Domäne und somit

die relevanten Bindestellen der jeweiligen Interaktionspartner umfassten. Rab1b₃₋₁₇₄, Rab5a₂₋₂₁₆, Rab6a₂₋₂₁₁, Rab7a₂₋₂₀₇ und Rab8a₆₋₁₇₆ konnten nach etablierten Protokollen problemlos in ausreichenden Mengen aufgereinigt werden.^{162,163,268,276} Rab9a₁₋₂₀₃ und Rab11a₁₋₂₁₈ wurden durch die DPF in pOPINF Vektoren kloniert, in den bakteriellen Wirt transformiert und als Fusionsprotein mit *N*-terminalem His₆-Affinitätsanker und einer PreScission-Schnittstelle exprimiert. Nach Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie konnte dieser katalytisch durch TEV (*Tabacco Etch Virus Nla*)-Protease entfernt werden.

Der Nukleotidbindungszustand der Rab-Proteine hat einen entscheidenden Einfluss auf die Affinität der verschiedenen Bindungspartner. So weisen Effektoren wie *Rab6-interacting protein 1* (R6IP1), LidA, Rabaptin5, *Rab interacting lysosomal protein* (RILP), *GRIP and coiled-coil domain-containing protein 185* (GCC185) und *Family interacting protein 2/3* (FIP2/FIP3) die stärkste Affinität zur GTP-assoziierten, aktivierten Form von Rab-Proteinen auf. Dagegen binden Nukleotidaustauschfaktoren wie Rabin8 bevorzugt an nukleotidfreie Rab-GTPasen, während Eskortproteine wie *Rab escort protein 1* (REP1) insbesondere an GDP-assoziierte Rab-Proteine binden. Daher wurden die Rab-GTPasen in den drei Nukleotidbindungszuständen (GTP- und GDP-gebunden sowie nukleotidfrei) hergestellt und untersucht. Die meisten Rab-Proteine liegen nach der Aufreinigung vorwiegend in der GDP-gebundenen Form vor. Lediglich Rab6 weist eine derart niedrige intrinsische GTP-Hydrolyserate auf, dass es in der GTP-assoziierten Form erhalten wird.^{162,277} Für alle anderen Rab-Proteine wurde GTP durch das hydrolysestabile Derivat GppNHp ersetzt. Ohne die stabilisierende Wirkung eines zugehörigen GEFs, das die Kontakte des fehlenden Nukleotids durch zusätzliche Wechselwirkungen kompensieren kann, sind nukleotidfreie Rab-Proteine thermodynamisch relativ instabil und neigen zur Aggregation.²⁷⁸ Daher konnten nur vergleichsweise geringe Maximalkonzentrationen erreicht werden, wobei die Stabilität der verschiedenen Rabs teils deutlich variierte (Abbildung 31). Dadurch bedingt konnte bei der Affinitätsmessung teils nicht bis in den Sättigungsbereich titriert werden, sodass die Bindungskurven extrapoliert werden mussten, um einen Vergleich des Bindungsverhaltens zu ermöglichen.

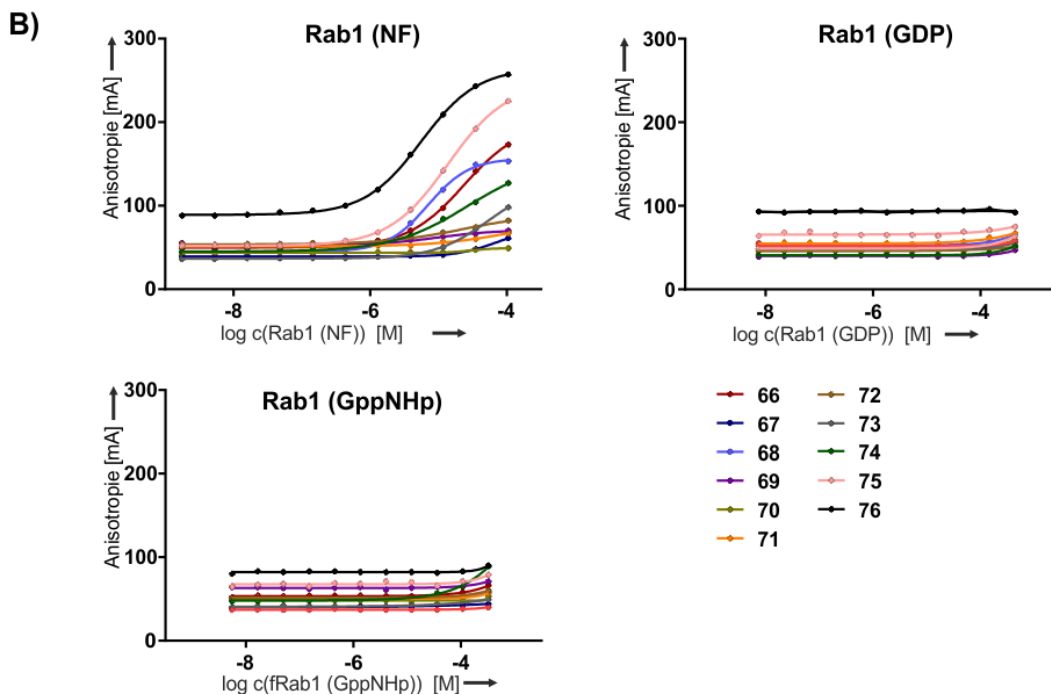
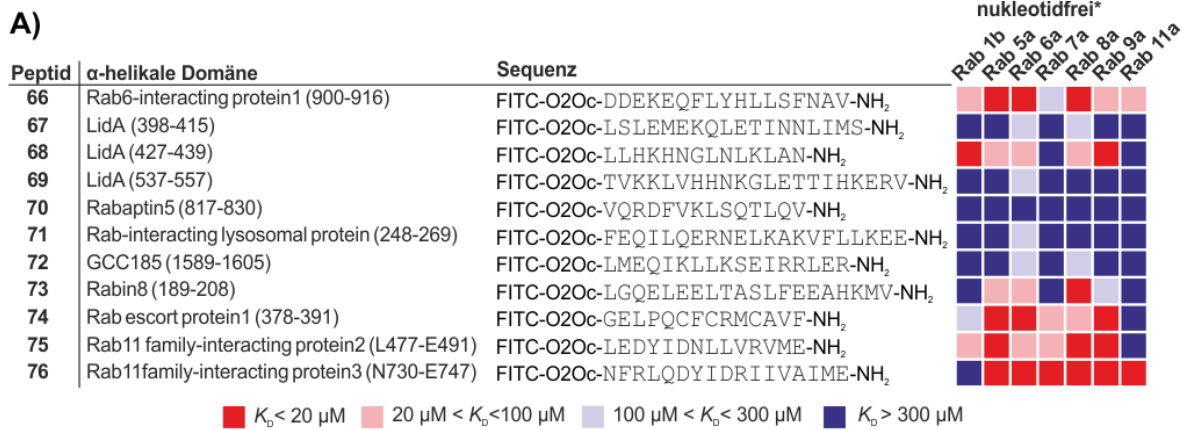


Abbildung 31. Untersuchung α -helikaler Wechselwirkungsmotive aus Rab-Bindungspartnern. A) Die vielversprechendsten Peptidsequenzen wurden als N-terminale Fluorescein-Konjugate dargestellt. Die „Heatmap“-Darstellung der Ergebnisse des Fluoreszenzpolarisations-Bindungsexperiments gibt eine Übersicht über die Dissoziationskonstanten mit verschiedenen nukleotidfreien Rab-Proteinen. * Nukleotidfreie(NF) Rab-Proteine zeigen häufig eine geringe Löslichkeit, was sich in relativ niedrigen maximalen Proteinendkonzentrationen äußert (maximale Konzentration im FP-Assay: Rab1b(NF)=105 μM , Rab5a(NF)=4 μM , Rab6a(NF)=140 μM , Rab7a(NF)=57 μM , Rab8a(NF)=34 μM , Rab9a(NF)=5 μM , Rab11a(NF)=171 μM). Einige Bindungskurven erreichten kein Plateau und wurden daher extrapoliert, um vergleichbare K_D -Werte zu erhalten. B) Repräsentative Daten der Fluoreszenzpolarisationsmessungen.²⁷⁹

Im Fluoreszenzpolarisations-Assay zeigten alle untersuchten Peptide geringe Affinitäten ($K_D > 300 \mu\text{M}$) für die GDP- und GTP-gebundenen Rab-Proteine. Obgleich die getesteten Peptide teilweise die gesamte Wechselwirkungsfläche der jeweiligen Proteine enthalten und somit eine vergleichbare Affinität erhofft wurde, ist das Ergebnis nicht vollkommen unerwartet. So verlieren Peptidsequenzen oftmals ihre ursprüngliche Sekundärstruktur, wenn sie aus der stabilisierenden Tertiärstruktur des Ausgangsproteins entfernt werden. Da dem deutlich flexibleren Peptid bei

Assoziation an das Rab-Protein mehr Konformationsfreiheitsgrade verloren gehen, wird das Bindungsereignis bedingt durch entropische Verluste geschwächt.^{24,25} Dagegen zeigten einige der Peptide für die nukleotidfreien Rab-Proteine deutlich höhere Affinitäten (Abbildung 31 und Anhang Tabelle 15), sechs der Peptide (**66**, **68**, **73** - **76**) sogar mit Dissoziationskonstanten im niedrigen mikromolaren Bereich ($K_D < 20 \mu\text{M}$). Die Selektivität für die einzelnen Rabs war dabei gering. Allerdings ist für einige der ursprünglichen Bindungspartner, aus denen die Peptidsequenzen entstammen, bekannt, dass sie an mehrere verschiedene Rab-GTPasen binden. In vielen Fällen besteht zudem keine Klarheit, ob die Ausgangsproteine mit weiteren Rabs assoziieren. So sind Studien, die systematisch das Interaktom von Rab-GTPasen untersuchen, bisher relativ selten. Die wenigen bisher verfügbaren Daten deuten daraufhin, dass oftmals eine unerwartet breite Substratspezifität besteht.^{158,159} Zudem bilden die isolierten α -helikalen Bindungsepitope in manchen Fällen nur einen Teil der ursprünglichen Interaktionsfläche ab. Darüber hinaus ermöglicht die höhere strukturelle Flexibilität der nukleotidfreien Rab-Proteine innerhalb der Switch 1- und Switch 2-Region und des P-Loops möglicherweise eine *induced fit*-Bindung, bei der die Peptide eine bindende Konformation innerhalb der flexiblen Regionen induzieren können.

Aus den Peptiden mit den höchsten Bindungsaffinitäten wurden vier Sequenzen für die nachfolgende Stabilisierung ausgewählt. Um einen möglichst repräsentativen Überblick für das Potential dieses Ansatzes zu schaffen, wurden Peptidsequenzen aus verschiedenen Klassen an Bindungspartner näher untersucht: zwei Sequenzen abgeleitet von Effektoren (**66** aus R6IP1 und **68** aus LidA), eine Sequenz abgeleitet von einem Nukleotidaustauschfaktor (**73** aus Rabin8) und eine Sequenz aus einem Eskortprotein (**74** aus REP1).

5.3.3 Gestaltung und Synthese α -helikal stabilisierter Peptid-Strukturen

Analog zur Adressierung der Ras–SOS-Wechselwirkung in Kapitel 5.2.2 wurden kohlenwasserstoffverbrückte Derivate synthetisiert, um Peptid-basierte Rab-Modulatoren mit potentiell vielversprechenden pharmakologischen Eigenschaften zu generieren. Der Einbau der Kohlenwasserstoffverbrückung erfolgte entsprechend der bereits diskutierten Gestaltungsprinzipien auf Basis der jeweiligen Kristallstrukturen, in der $i, i + 4$ -Verbrückungsarchitektur.

In den Kristallstrukturen der Ausgangsproteine wurden Reste identifiziert, die nicht an der Bindung beteiligt sind und bei denen die Einbringung der α -methylierten Kohlenwasserstoffverbrückung voraussichtlich keine sterische Hinderung mit dem jeweiligen Rab-Protein erzeugt. So ergaben sich aus der Struktur des R6IP1–Rab6a-Komplexes fünf verschiedene Positionen für den Einbau der nicht-natürlichen Aminosäuren (Abbildung 32). Im Falle der $i, i + 4$ -Architektur erlaubte dies den Einbau dreier unterschiedlicher Verbrückungen (**77** - **79**). Darüber hinaus wurde noch ein verkürztes Peptid (**80**) synthetisiert, um den Einfluss der drei negativ geladenen *N*-terminalen Reste (Asp-Asp-Glu) zu untersuchen. Basierend auf dem LidA-Rab8a-Komplex ergaben sich anhand der gleichen Gestaltungsprinzipien die drei verbrückten Derivate (**81** - **83**). Anhand der Struktur des REP1–Rab7a-Komplexes wurden ebenfalls drei Peptide (**84** - **86**) generiert, während auf Grundlage der Rabin8–Rab8a-Wechselwirkung für die längere Rabin8 α -Helix vier Peptide (**87** – **90**) entworfen wurden. Dabei wurden neben der Rabin8–Rab8-Wechselwirkung auch die Kontakte der Doppelwendel-Interaktion der katalytischen Domäne von Rabin8 in die Planung der Verbrückungen mit einbezogen, um eine potentiell gleichzeitige Bindung zweier stabilisierter Peptide zu ermöglichen.

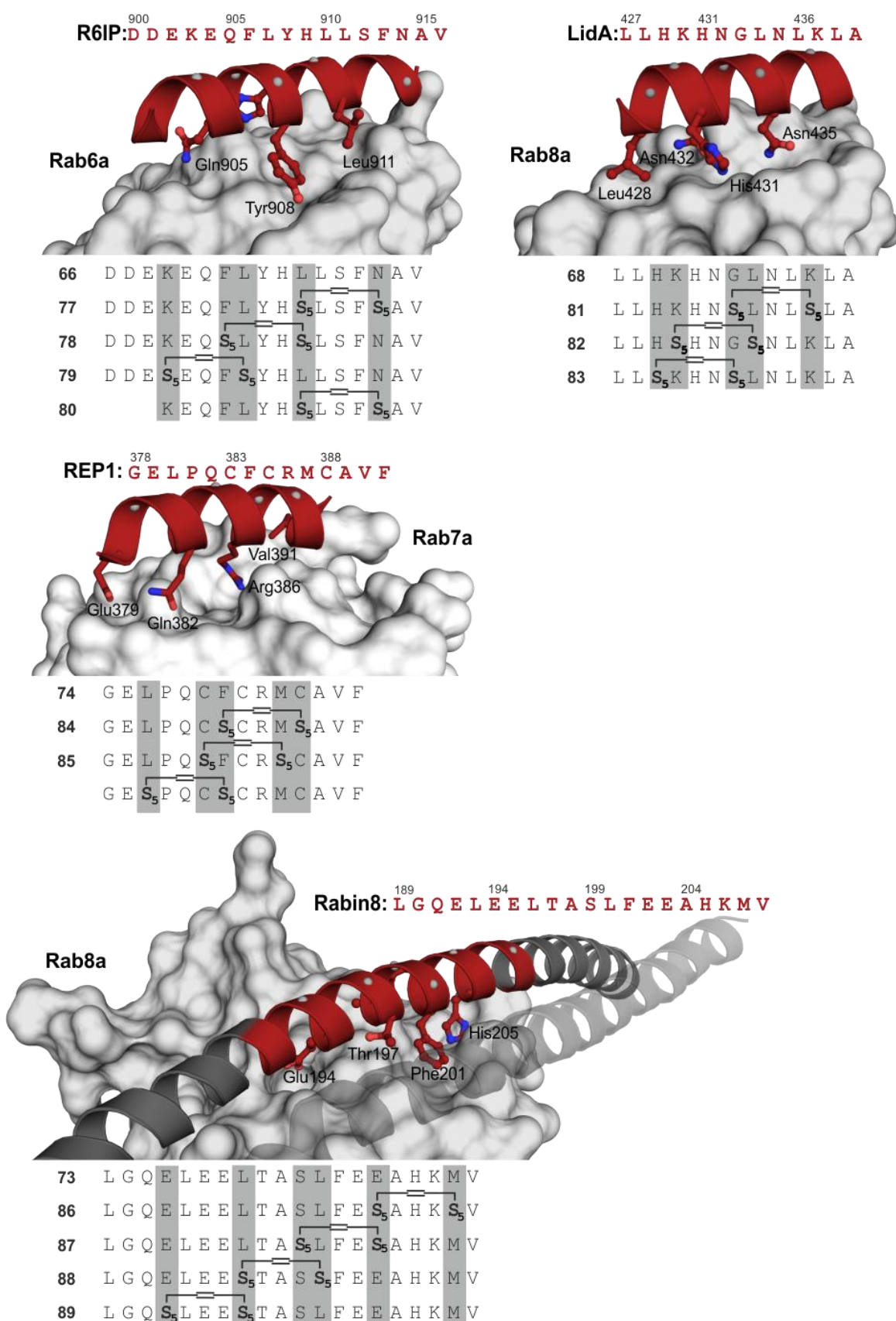


Abbildung 32. Planung des Einbaus α -methylierter, Kohlenwasserstoffverbrückungen in die Wildtyp-Peptidsequenzen auf Basis der Kristallstrukturdaten. Strukturen des R6IP1–Rab6a-Komplexes (PDB 3CWZ), LidA–Rab8a-Komplexes (PDB 3TNF), REP1–Rab7a-Komplexes (PDB 1VG0) und Rabin8–Rab8a-Komplexes (PDB 4HLX). An der Bindung beteiligte Seitenketten sind explizit dargestellt und Positionen, die für den Einbau des Bausteins **48** ausgewählt wurden, sind grau hervorgehoben.

Die Synthese der seitenkettenverbrückten Peptide erfolgte, wie bereits beschrieben, an NovaSyn-TGR-Harz unter Standard-Fmoc-Bedingungen (Abbildung 14) und mit Grubbs I-Katalysator für die Ringschlussmetathese. Einzig das Leu380 - Phe384-verbrückte Derivat aus REP1 war synthetisch nicht zugänglich, da die Olefinmetathese nicht zum Ringschluss führte. Auch wiederholte und ausgedehnte Reaktionszeiten sowie der Einsatz anderer Katalysatoren und Mikrowellenbestrahlung bewirkten keine hinreichende Verbesserung. In Anbetracht der Tatsache, dass die beiden analogen Derivate **84** und **85** synthetisch zugänglich waren, sind die Schwierigkeiten bei der Makrozyklisierungsreaktion wahrscheinlich auf die Helix-brechenden Eigenschaften des Pro381 Restes zurückzuführen.

5.3.4 Bindungsverhalten und strukturelle Eigenschaften seitenkettenverbrückter Peptide Rab-bindender Peptide

Analog zu den Wildtyp-Peptiden wurden *N*-terminal mit Fluorescein-PEG konjugierte Derivate (**77a** – **89a**) in einem FP-Assay auf ihr Bindungsverhalten bezüglich der Rab-Proteine Rab1b/-5a/-6a/-8a/-9a und -11a in allen drei Nukleotidbindungszuständen untersucht. Im Fall der nukleotidfreien Rabs zeichneten sich fast alle stabilisierten Peptide durch verbesserte Affinitäten im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp-Peptid aus. Die Affinitätsgewinne variieren dabei beträchtlich und erreichten eine bis zu 200-fache Steigerung.

Nur für die stabilisierten Peptide **81a** (für Rab9a(NF), und Rab11a(NF)) und **82a** (für alle nukleotidfreien Rabs) konnte keine erhöhte Affinität beobachtet werden. Die *N*-terminale Verkürzung der Peptidsequenz **77** bewirkte einen deutlichen Affinitätsverlust (**80**).

Die Dissoziationskonstanten einiger Liganden erreichten dabei sogar den submikromolaren Bereich. Die höchsten Affinitäten wurden für **79a**/Rab11 ($K_D = 0.40 \pm 0.02 \mu\text{M}$) und **84a**/Rab8a ($K_D = 0.42 \pm 0.03 \mu\text{M}$) bestimmt. Die besten Binder für Rab1b(NF), Rab5a(NF) und Rab6a(NF) wiesen ähnlich niedrige Dissoziationskonstanten im Bereich zwischen $1.0 \mu\text{M}$ und $1.1 \mu\text{M}$ auf. Dabei konnte durch den Einbau der Kohlenwasserstoffverbrückung ein bis zu ~ 40 -facher Affinitätszuwachs erzielt werden. Lediglich für Rab9(NF) wurden K_D s über $10 \mu\text{M}$ beobachtet.

Wie bereits die Wildtyp-Peptide zeigten auch die stabilisierten Derivate eine geringe Diskriminierung zwischen den verschiedenen Rab-Proteinen. Unter Annahme eines zum Ursprungprotein vergleichbaren α -helikalen Bindungsmodus, ist dies allerdings nicht unerwartet,

da der Einbau der Kohlenwasserstoffverbrückung und die damit verbundene Reduzierung der konformativen Freiheitsgrade vornehmlich den entropischen Verlust der Bindung kompensiert und sich somit auf die Affinität und weniger auf die Selektivität der Peptide auswirkt.

Auch zeigten die verbrückten Peptide eine geringe Affinität ($K_D > 100 \mu\text{M}$) gegenüber den GDP-gebundenen und den meisten GTP-/GppNHp-gebundenen Rabs, was auf die geringen Affinitäten der Wildtyp-Peptide zurückzuführen ist. Einige der untersuchten Peptide banden jedoch an Rab8a in seiner GppNHp-assoziierten Form. Sechs Peptide (**77a**, **84a**, **85a** - **87a**, **89a**) zeigten moderate Affinitäten mit Dissoziationskonstanten im Bereich von $50 \mu\text{M}$ bis $100 \mu\text{M}$. Allerdings band das von R6IP1 abgeleitete Peptid **79a** aktiviertes Rab8a(GppNHp) mit einem K_D von $22.2 \pm 1.2 \mu\text{M}$, was bereits im Bereich einiger natürlicher Rab-Effektoren liegt.^{262,280} Dabei zeigte **79a** eine mindestens 5-fache Selektivität für Rab8a(GppNHp) gegenüber allen anderen getesteten Rab-Proteinen. Diese kann auch deutlich höher liegen, weil aufgrund der niedrigen Affinitäten für andere Rabs in der GppNHp-gebundenen Form keine exakten Werte bestimmt werden konnten. Damit stellt **79** den ersten Binder einer Rab-GTPase in ihrer aktivierten, GTP-gebundenen Form im niedrigen mikromolaren Bereich dar.

Anschließend wurde der Einfluss der Verbrückungen auf die Sekundärstruktur der Peptide bestimmt. Dazu wurden die stabilisierten Peptide *N*-terminal mit Essigsäureanhydrid acetyliert (**66b – 89b**) und mittels Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie untersucht (Abbildung 33C).²⁸¹ Generell bewirkte die Isolierung der α -helikalen Bindungsepitope aus den Ursprungproteinen einen deutlichen Verlust der konformativen Stabilität. So war die α -Helizität der Wildtyp-Peptide (**66b, 68b, 73b, 74b**) in Lösung gering und bewegte sich in einem Bereich von 2 – 10%. In den meisten Fällen konnte die Makrozyklisierung den α -helikalen Charakter der Peptide im Vergleich zu den unmodifizierten Startsequenzen zwar erhöhen, jedoch wiesen viele Peptide noch immer eine relativ niedrige α -Helizität auf. Den höchsten α -helikalen Anteil erreichten dabei die Peptide **77b** (36%) und **86b** (35%). Wie am Beispiel von **77b/80b** zu sehen ist, kann eine Verlängerung der Peptidsequenz zur Erhöhung des α -helikalen Charakters beitragen. Allerdings umfassen die Peptide, die von R6IP1 **77 – 80**, LidA **81 – 83** und REP1 **86 – 89** abgeleitet wurden, bereits die vollständige Sequenz der α -helikalen Bindungsepitope, sodass dies lediglich im Fall der ohnehin schon relativ langen Sequenz aus Rabin8 eine Option darstellt.

Der α -helikale Charakter korrelierte nicht immer mit gesteigerter Affinität zum Zielprotein. Zwar zeigten in vielen Fällen Peptide mit höherem α -helikalen Charakter auch gesteigerte Affinitäten zu den Rab-Proteinen. Oftmals war jedoch in einer Gruppe von Derivaten der jeweils affinste Binder nicht das Peptid mit der höchsten α -Helizität. Dieses Phänomen wurde allerdings bereits in vielen anderen Studien für α -helikal stabilisierte Peptide beobachtet.⁷⁹ Offenbar stabilisiert die Verbrückung an einer bestimmten Position die bioaktive Konformation, aber nicht zwingend die α -helikale Konformation in Lösung. Auch wurde bereits für eine Reihe α -methylierter, kohlenwasserstoffverbrückter Peptide gezeigt, dass die Verbrückung mit dem Zielprotein interagieren kann und so zusätzlich zur Bindung beiträgt. Ein derartiges Peptid muss aber nicht notwendigerweise die größte α -Helizität in Lösung aufweisen.

5.3.5 Funktionale Evaluation Rab-bindender Peptide

Die Regulation und Signalwirkung von Rab-Proteinen basiert auf einem komplexen Netzwerk aus PPIs mit unterschiedlichen Klassen an Interaktionspartnern. Diese Wechselwirkungen sind im Wesentlichen abhängig vom Nukleotidbindungsstatus der GTPase, sodass Bindungspräferenzen Rückschlüsse auf den funktionalen Zusammenhang erlauben können. Bei der Affinitätsbestimmung der kohlenwasserstoffverbrückten Peptide zu Rab-Proteinen in den drei

verschiedenen Nukleotidbindungszuständen ergaben sich interessante Bindungsprofile, auf deren Grundlage sich einige potentielle Anwendungen ergeben, die im Folgenden näher untersucht wurden.

Einfluss auf den Nukleotidaustausch von Rab8a

Die Ausbildung stabiler Komplexe mit GTPasen im nukleotidfreien Zustand gilt für Proteine gemeinhin als ein wesentliches Charakteristikum von Nukleotidaustauschfaktoren und wurde experimentell genutzt, um bisher unbekannte GEFs zu identifizieren.^{116,268} Während GEFs zumeist eine relativ moderate Affinität zu GDP-gebundenen GTPasen zeigen, binden sie um Größenordnungen stärker an die nukleotidfreie Form, um durch ausgedehnte Wechselwirkungen den thermodynamisch instabilen Zustand zu stabilisieren und die GTPasen vor Fehlfaltung oder Aggregation zu schützen. Dabei liegen die Affinitäten für den GDP-gebundenen Zustand der Rab-Proteine oft im mittleren bis hohen mikromolaren Bereich, während sie für die nukleotidfreie Form mit Dissoziationskonstanten bis in den niedrigen nanomolaren oder subnanomolaren Bereich vorliegen können.^{156,268,275,282}

Zahlreiche der stabilisierten Peptide zeigten eine deutlich gesteigerte Affinität zu Rab-Proteinen im nukleotidfreien Zustand, teils mit Dissoziationskonstanten im submikromolaren Bereich. Obgleich die relativen Affinitäten im Vergleich zu katalytischen Domänen aus entsprechenden GEF-Proteinen geringer sind, liegt dennoch ein vergleichbares Affinitätsprofil vor. Die Peptide **86 – 89** sind sogar vom GEF Rabin8 abgeleitet und enthalten das vollständige Bindungsepitop der katalytisch aktiven Domäne (Abbildung 30). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die stabilisierten Peptide Auswirkungen auf die intrinsische Nukleotidaustauschrate von Rab8 oder auf den Rabin8-katalysierten Nukleotidaustausch zeigen. Dazu wurde Rab8 mit einem fluoreszenten GDP-Derivat Methylantraniloyl(mant)-GDP²⁸³ beladen. Der Fluoreszenzmarker ist kovalent an die 2'- bzw. 3'-Hydroxylgruppe der Ribose von GDP gebunden und hat keine bzw. nur minimale Auswirkung auf die Funktionsfähigkeit und Wechselwirkungen von Rab-Proteinen und ihren Bindungspartnern.^{156,275} Die umgebungssensitive mant-Gruppe zeigt einen Fluoreszenzanstieg bei Bindung an Rab8 und ermöglicht so, den Fortgang der Nukleotidaustauschreaktion zu verfolgen. Auch ohne die Präsenz eines Nukleotidaustauschfaktors zeigt Rab8 eine messbare, wenn auch geringe Nukleotidaustauschrate.^{284,285} Um zu untersuchen, ob diese durch seitenkettenverbrückte Peptide beeinflusst wird, wurde Rab8(mantGDP) mit *N*-terminal acetylierten Derivaten der

stabilisierten Peptide inkubiert, die eine niedrig mikromolare oder submikromolare Affinität ($K_D < 5 \mu\text{M}$) zur nukleotidfreien Form von Rab8 gezeigt hatten (**79 – 81** und **84 – 80**). Anschließend wurde die Austauschreaktion durch Zugabe eines 500-fachen Überschusses an freiem GDP gestartet. Da ein vergleichsweise geringer Effekt erwartet wurde, mussten die Peptide in hohem Überschuss (bis zu 100-fach bezogen auf die Rab-Konzentration) eingesetzt und die Messungen über einen langen Zeitraum durchgeführt werden. Dabei wurden die Messungen allerdings teils durch begrenzte Löslichkeiten der Peptide und begrenzte Proteinstabilität limitiert und durch Signalfluktuationen und Verdunstungseffekte zusätzlich erschwert. Dabei zeigten jedoch alle untersuchten Peptide weder eine Beschleunigung noch eine Verlangsamung der intrinsischen Austauschrate (Abbildung 34). Auch die Bildung eines Rab(NF)–Peptid-Komplexes und die damit verbundene Verdrängung des markierten Nukleotids im ersten Schritt wurde im Rahmen der Messgenauigkeit nicht beobachtet.

In früheren Studien wurde das Rabin8(Gly157-Leu232) Konstrukt als das minimale GEF aktive Fragment identifiziert.¹⁵⁶ Aus der Kristallstruktur des Rab–Rabin8-Komplexes ergibt sich, dass beide Stränge der Rabin8 Doppelwendel etwa zu gleichen Teilen zur Interaktion mit Rab8 beitragen. Die Peptide **86 – 89** enthalten dabei sämtliche Kontaktstellen (Leu189 – Val208), die das parallele Homodimer der Rabin8 GEF-Region im Komplex mit Rab8 aufweist. Die Kohlenwasserstoffverbrückungen, die zur Stabilisierung der α -helikalen Struktur beitragen, sind zwar dergestalt in die Sequenz eingebaut, dass sie prinzipiell die gleichzeitige Bindung zweier Peptide als Homodimer erlauben, leisten aber keinen Beitrag zur Stabilisierung eines Dimers. Innerhalb der katalytisch aktiven Rabin8-Sequenz(Gly157-Leu232) tragen dagegen mehrere Reste zur Stabilisierung der bioaktiven Doppelwendel-Struktur bei, wie z.B. eine intermolekulare Disulfidbrücke von Cys179. Möglicherweise wäre eine zusätzliche intermolekulare Stabilisierung des Homodimers erforderlich, um GEF-Aktivität zu generieren. Darüber hinaus stellt die geringe Affinität zum GDP-gebundenen Zustand von Rab8 ein zusätzliches Hindernis dar. So muss während des Nukleotidaustauschprozess zunächst ein ternärer Rab8(GDP)–Rabin8-Komplex gebildet werden, der konformative Änderungen der Rab8-Struktur bedingt und dadurch die Freisetzung von GDP erlaubt.¹⁵⁶

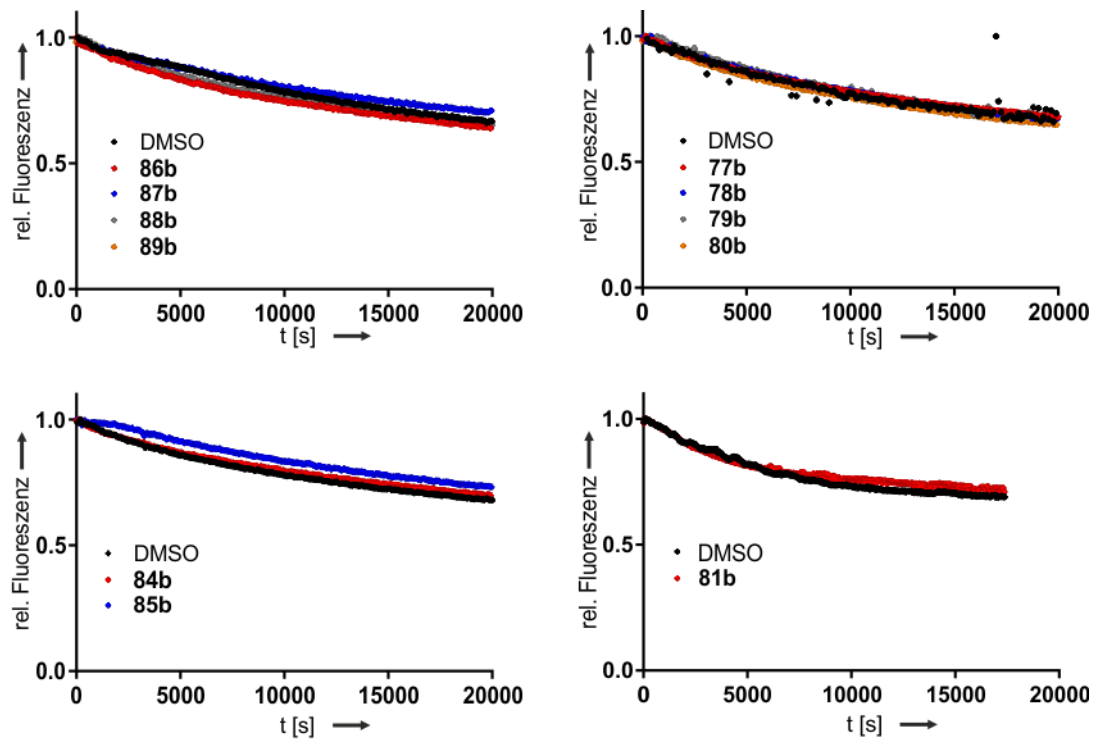


Abbildung 34. Einfluss seitenkettenverbrückter Peptide auf die intrinsische Nukleotidaustauschrate von Rab8. Der Austausch des umgebungssensitiven, fluoreszenten Nukleotidderivats mantGDP wurde in Abhängigkeit der Zeit beobachtet, nachdem die Reaktion durch Zugabe eines Überschusses an GDP (500 μM) gestartet wurde. Rab8(mant-GDP) ($1\mu\text{M}$) zeigt keine veränderte Dissoziationskinetik in Gegenwart von *N*-terminal acetylierter Peptide ($100\mu\text{M}$).

Anschließend wurde untersucht, ob die von Rabin8 abgeleiteten Peptide (**87 – 89**) dessen GEF-Aktivität unterdrücken können. Dazu wurde Rab8-mantGDP mit einer katalytischen Menge der Rabin8 GEF-Domäne und *N*-terminal acetyliertem Peptid vorinkubiert und die Nukleotidaustauschreaktion durch Zugabe eines Überschusses an GDP gestartet. Allerdings wurde selbst bei niedrigen Konzentrationen an Rabin8 und zehnfachem Peptidüberschuss im Rahmen der Messgenauigkeit keine signifikante Beeinflussung der Dissoziationskinetik beobachtet (Abbildung 34). Möglicherweise sind die Affinitäten der Peptide zu gering, um wirksam mit Rabin8 in Konkurrenz zu treten. Die Verwendung höherer Inhibitorkonzentrationen war jedoch bedingt durch die limitierte Löslichkeit der kohlenwasserstoffverbrückten Peptide nicht möglich, wohingegen noch geringe Rabin8 Konzentrationen einen von der intrinsischen Austauschrate unzureichend unterscheidbaren Reaktionsverlauf lieferten.

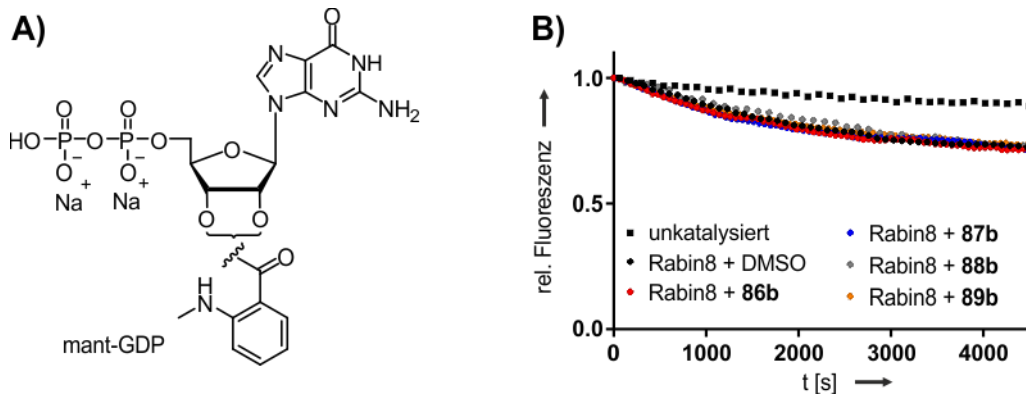


Abbildung 35. Inhibition der GEF-Aktivität von Rabin8 durch α -methylierte, kohlenwasserstoffverbrückte Peptide. A) Das fluoreszente, umgebungssensitive Nucleotidderivat mant-GDP. B) GEF-Assay: Rab8-mantGDP ($2 \mu\text{M}$) wurde mit dem GEF His-Rabin8 ($9 \mu\text{M}$) oder mit Rabin8 ($9 \mu\text{M}$) und einem *N*-terminal acetylierten Peptid ($100 \mu\text{M}$) inkubiert und die Austauschreaktion durch Zugabe eines Überschusses an GDP ($500 \mu\text{M}$) gestartet. Keines der verbrückten Peptide inhibierte den Rabin8-katalysierten Nucleotidaustausch.

Rabin8 bindet die nukleotidfreie Form von Rab8 um etwa zwei Größenordnungen stärker als die kohlenwasserstoffverbrückten Peptide. So wurde für vergleichbare Rab8(NF)-GRAB-Wechselwirkung eine Dissoziationskonstante von 16.5 nM bestimmt.¹⁵⁶ Im Fall von Rab8(GDP) (Rab8(GDP)-GRAB $K_D = 43 \mu\text{M}$) konnte das genaue Verhältnis aufgrund der geringen Affinität ($K_D > 300 \mu\text{M}$) der Peptide nicht ermittelt werden. Vergleichbare mittels Wasserstoffbrückenersatz stabilisierten Peptidsequenzen der Ras-SOS-Wechselwirkung von Patgiri *et al.* beeinträchtigen den Nucleotidaustausch von Ras *in vitro* und *in vivo*. Die Dissoziationskonstante des besten Peptids, HBS3 mit Ras(NF) ($K_D = 28 \mu\text{M}$),²⁰⁵ liegt ebenso um mehrere Größenordnungen über der von $\text{SOS}_{\text{kat.}}$ -Domäne (analoge murine HRas-Cdc25-Interaktion: $K_D = 4.6 \text{ nM}$).²⁸⁶ Die Affinitäten für die GDP-gebundene Form unterscheiden sich aber nur um etwa das zehnfache ($K_D(\text{Ras(GDP)-SOS}_{\text{kat.}}) = 15 \mu\text{M}$ und $K_D(\text{Ras(GDP)-HBS3}) = 158 \mu\text{M}$). Möglicherweise liegt die ausbleibende Wirksamkeit der Rabin Peptide also darin begründet, dass diese nur unzureichend mit Rabin8 um die Bindung an Rab8(GDP) konkurrieren können. So verläuft die Rabin8 katalysierte Nucleotidaustauschreaktion nach einer Kinetik Pseudo-1. Ordnung, bei der die initiale Bildung des ternären Rab(GDP)-Rabin8-Komplexes den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt und die GTPase nur kurz in der nukleotidfreien Form verbleibt.¹⁵⁶ Außerdem ist nicht auszuschließen, dass die Peptide an einer vom Ausgangsprotein abweichenden Position von Rab8(NF) binden und damit nicht die Rab8-Rabin8-Wechselwirkung inhibieren können.

Inhibition einer Rab8–Effektor-Wechselwirkung

Das Peptid **79a** zeigte im Fluoreszenzpolarisationsexperiment die höchste Affinität zur GppNHp-assoziierten, aktivierten Form von Rab8a. Die Dissoziationskonstante des Peptids im niedrigmolekularen Bereich liegt sogar in der gleichen Größenordnung einiger natürlicher Effektoren. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von **79** auf eine Rab8-Effektor-Bindung untersucht. Exemplarisch wurde die Wechselwirkung mit dem Effektor *oculocerebrorenal syndrome of Lowe protein* (OCRL1) gewählt. OCRL1 ist ein peripheres Membranprotein, das hauptsächlich am Golgi Apparat lokalisiert ist und dessen Fehlfunktionen mit dem Ausbruch und dem Fortschreiten des Lowe Syndroms in Verbindung stehen und zu Fehlfunktionen von Niere, Augen und Nervensystem führen.^{287,288} Zunächst wurde die Rab8 Bindungsdomäne von OCRL1 (Val539 - E901) rekombinant in *E. coli* exprimiert, aufgereinigt und anschließend mit *N*-Hydroxysuccinimid-Fluorescein unspezifisch markiert. Als Kontrolle wurde die Bindung der markierten OCRL1-Domäne zu Rab8a(GppNHp) im Fluoreszenzpolarisationsexperiment bestimmt. Die ermittelte Dissoziationskonstante von 1.7 μM lag dabei nahe an einem Literaturwert ($K_D = 0.9 \mu\text{M}$), der mittels ITC für unmodifiziertes OCRL1₅₃₉₋₉₀₁ erhalten wurde (Abbildung 36A).²⁸⁰ Dagegen zeigt Fluorescein-markiertes **79a** nur eine geringe Affinität zu unmodifiziertem OCRL1₅₃₉₋₉₀₁, wobei die schwache Assoziation bei hohen Proteinkonzentrationen möglicherweise auf unspezifische Wechselwirkungen zurückzuführen ist (Abbildung 36B).

Anschließend wurde ein vorgebildeter Proteinkomplex aus markiertem OCRL1₅₃₉₋₉₀₁ und Rab8(GppNHp) mit verschiedenen *N*-terminal acetylierten Peptiden titriert. Während die gering affinen Kontrollpeptide **66b** und **80b** nicht dazu in der Lage waren, die Bindung zu stören, wurde OCRL1 durch steigende Konzentrationen an **79b** aus einem Komplex verdrängt ($\text{IC}_{50} = 490 \pm 65 \mu\text{M}$). (Abbildung 36C).

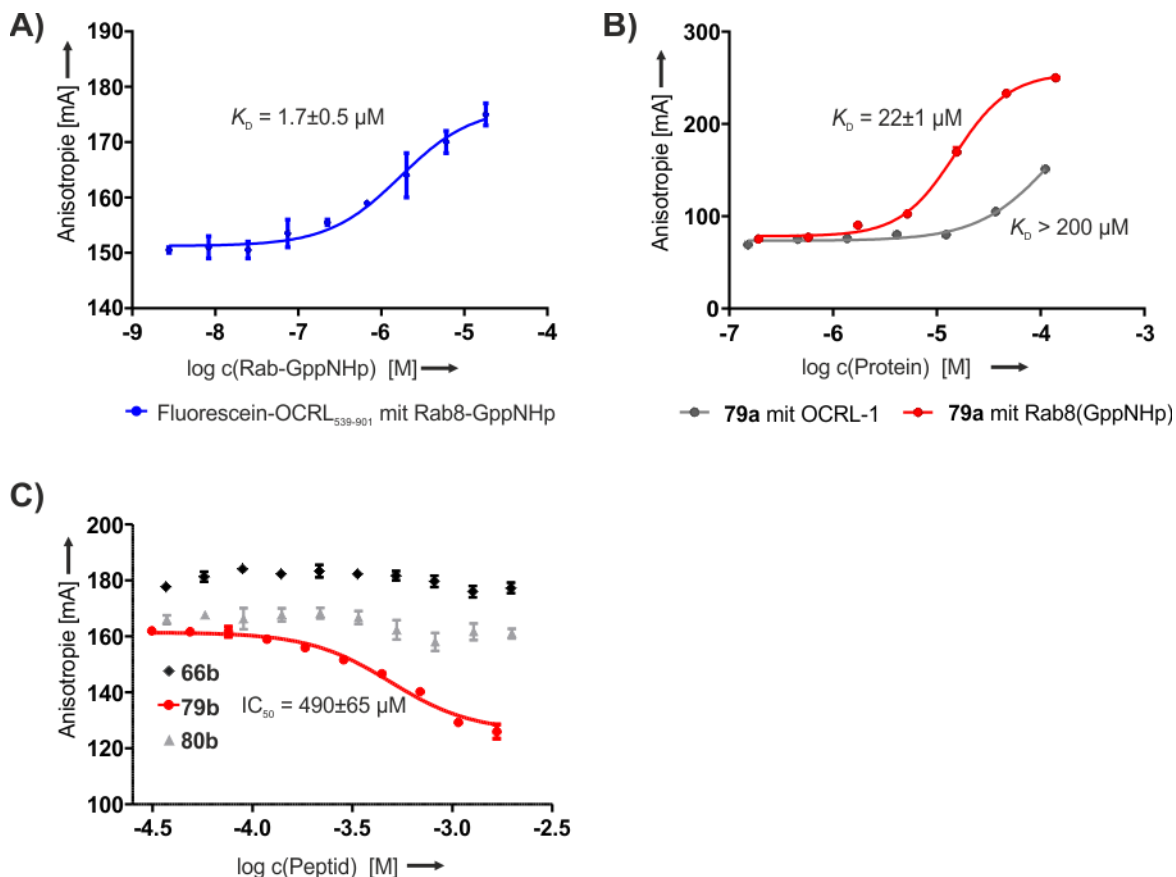


Abbildung 36. Das Peptid **79** wirkt als Inhibitor der Rab8–OCRL1-Wechselwirkung. a) Wechselwirkung der mit Fluorescein-markierten Effektor-Domäne OCRL1₅₃₉₋₉₀₁ mit Rab8(GppNHp) ($K_D = 1.7 \mu\text{M}$). b) Im Vergleich zur Bindung an Rab8(GppNHp) zeigt das Fluorescein-markierte Peptid **79a** nur eine sehr geringe Affinität zu OCRL1. c) Verdrängung von Fluorescein-markiertem OCRL1 aus einem Komplex mit Rab8(GppNHp) durch steigende Konzentrationen an acetyliertem Peptid **79b** ($IC_{50} = 490 \pm 65 \mu\text{M}$). Die acetylierten Kontrollpeptide **66b** und **80b** zeigen keinen Effekt.

Bindung des Zielproteins in Zelllysate und zelluläre Aufnahme des Peptids

(Die Analyse der zellulären Aufnahme der Peptide wurde von Dipl. Biol. Philipp Küchler durchgeführt)

Biologisch aktive Verbindungen müssen das Zielprotein auch in einer komplexen Mischung zellulärer Bestandteile und Proteine binden können. Aus diesem Grund wurde untersucht ob der beste Binder **79** mit Rab8(GppNHp) auch in Zelllysate noch stabil assoziieren kann. Dafür wurde ein Präzipitationsversuche mit HCT116-Lysate und auf Kunststoffkügelchen (*beads*) immobilisierten Peptiden durchgeführt. Die natürlichen Konzentrationen von Rab8 in Zelllysate lagen jedoch unterhalb der Nachweisgrenze des verwendeten Rab8-spezifischen Antikörpers. Daher wurde HCT116-Lysate eingesetzt, das mit 0.9 Gew.-% Rab8a(GppNHp) (bezogen auf die gesamte Proteinmenge) angereichert war. Die Peptide **79** und sein Vorläuferpeptid **66** wurden *N*-terminal mit Biotin und einer Linker-Gruppe funktionalisiert (**79c** und **66c**) und auf mit Streptavidin beschichteten Kunststoffkügelchen immobilisiert. Anschließend wurden die Kügelchen mit Lysate

inkubiert und die Präzipitationseffizienz in einer Western Blot-Analyse mit Hilfe eines Rab8-spezifischen Antikörpers ermittelt (Abbildung 37A). Die Ergebnisse spiegeln die Affinitätsverhältnisse wider, die im FP-Experiment ermittelt wurden und zeigen eine deutlich intensivere Bindung des kohlenwasserstoffverbrückten Peptids im Vergleich zur Wildtyp- bzw. Negativkontrolle.

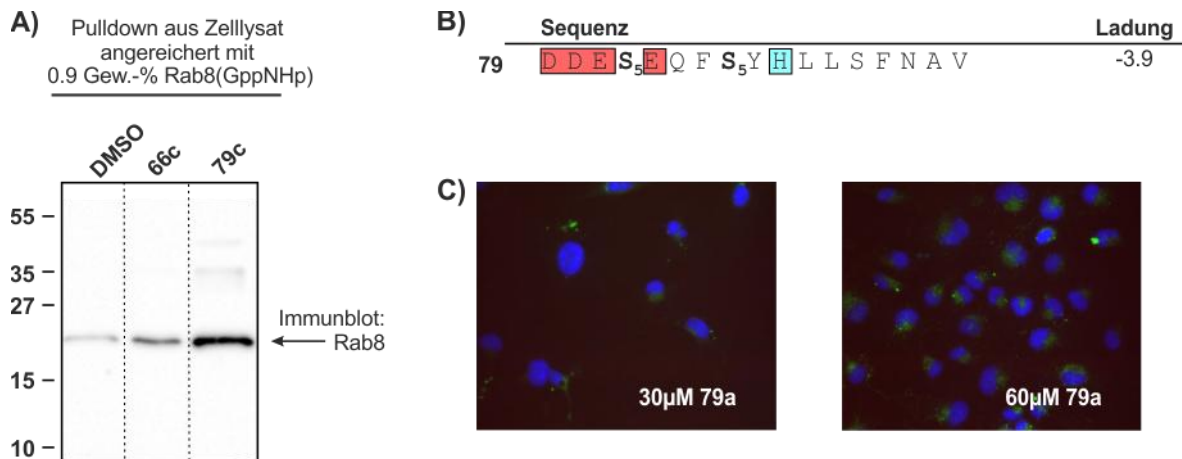


Abbildung 37. Bindung des Zielproteins in Zelllysate und zelluläre Aufnahme. A) Western-Blot Analyse eines repräsentativen Präzipitationsexperiments ($N = 3$; Fehler repräsentieren 1σ) mit *N*-terminal biotinylierten Derivaten **66c** und **79c** in HCT116 Zelllysate, das mit 0.9 Gew.-% Rab8(GppNHp) angereichert wurde. B) Ladungsanalyse von Peptid **79**. Reste mit negativem Beitrag sind rot gekennzeichnet, Reste mit positivem Beitrag blau gekennzeichnet. Die Berechnung erfolgte bei pH 7.4 mit Hilfe des *Peptide property calculator*s (Innovagen).²⁸⁹ C) Analyse der Aufnahme des Fluorescein-markierten Peptids **79a** in HCT116 Zellen (24h Behandlung) mittels Konfokalfluoreszenzmikroskopie. Überlagerte Abbildung mit nukleärer DNA (blau, Hoechst 33342) und Fluorescein (grün).

Bei Rab8 handelt es sich jedoch um ein intrazelluläres Zielprotein. Daher wurde im Anschluss die zelluläre Aufnahme des Peptids **79** in HCT116 Zellen untersucht. Dafür wurden die Zellen mit steigenden Konzentrationen an markiertem Peptid inkubiert. Anschließend wurden die Peptide durch Waschen entfernt, die Zellen fixiert und die Fluoreszenzintensität optisch unter einem Konfokalmikroskop kontrolliert (Abbildung 37C). Die Methode ist zwar vergleichsweise anfällig für falschpositive Artefakte (Abschnitt 2.4),^{107,112,290} jedoch hat sie sich in vergangenen Studien häufig als geeignet erwiesen, um die Aufnahme stabilisierter Peptide im Vorfeld abzuschätzen. Das Fluorescein-markierte Derivat **79a** zeigt dabei eine relativ moderate zelluläre Aufnahme, die erst bei hohen Konzentrationen ($>30 \mu\text{M}$) sichtbar in Erscheinung tritt. Generell haben kohlenwasserstoffverbrückte Peptide in der Vergangenheit zwar oftmals eine gesteigerte Zellgängigkeit gezeigt, das Ausmaß der Zellgängigkeit ist aber stark von der jeweiligen Sequenz und der Platzierung des hydrophoben Makrozyklus abhängig.^{79,109,291} Zudem ist die vergleichsweise niedrige Aufnahme möglicherweise auf den relativ niedrigen α -helikalen Charakter der Sequenz

zurückzuführen. Auch könnte die über die gesamte Sequenz gemittelte negative Gesamtladung des Peptids ein weiteres Hindernis für eine zelluläre Aufnahme sein, denn obwohl die genauen Aufnahmemechanismen der Peptide noch immer nicht ganz verstanden sind, haben üblicherweise Peptide mit positiver Gesamtladung und/oder teils hydrophobem Charakter die tendenziell beste Aufnahme gezeigt.^{113,292}

5.4 Optimierung eines α -helikalen Rab8-Effektor-Inhibitors

Im Zuge der durchgeführten Übersichtsstudie konnte die prinzipielle Anwendbarkeit kohlenwasserstoffverbrückter Peptide als Inhibitoren von Rab-PPIs gezeigt werden. Jedoch weisen die Peptide dieser ersten Generation bedeutende Limitierungen, wie unzureichende Affinität zum Zielprotein und geringe zelluläre Aufnahme auf, die sie für einen Einsatz als Werkzeuge für biologische Untersuchungen oder mögliche pharmakologische Anwendungen ungeeignet machen. Daher wurde in einer folgenden Studie versucht die Eigenschaften des Peptids **79** weiter zu verbessern.

5.4.1 Kristallisationsstudien

(Die Kristallisationsstudien wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Emmerich Mihai Gazdag durchgeführt)

Die höchste Affinität zu Rab8(GppNHp) zeigte das von R6IP1 abgeleitete Peptid **79**. Rab6 und Rab8 wirken zwar im gleichen Transportweg (trans-Golgi-zu-Plasmamembran) und sind möglicherweise über R6IP1 verknüpft,²⁹³ im Gegensatz zur Rab6–R6IP1-Interaktion wurde eine direkte Rab8-R6IP1-Wechselwirkung bisher jedoch nicht nachgewiesen bzw. strukturell untersucht. Um die Bindungsverhältnisse aufzuklären, sollte **79** im Komplex mit Rab8(GppNHp) mittels Röntgenkristallstrukturanalyse untersucht werden. Dafür wurde das Kristallisationskonstrukt Rab8a₆₋₁₇₆ exprimiert und aufgereinigt, das um einige dynamische und flexible Abschnitte verkürzt ist. Bei der Herstellung der Kristallisationsansätze wurde das verkürzte Rab8 entweder aufkonzentriert und mit einem Überschuss an acetyliertem **79b** versetzt oder direkt in Gegenwart des Peptids aufkonzentriert. Dabei hatte das Peptid jedoch keinen erkennbaren Einfluss auf die Löslichkeit von Rab8. Anschließend wurden zahlreiche Kristallisationsbedingungen in einem Hochdurchsatzverfahren getestet. Nach wenigen Tagen wurden unter einigen Bedingungen

nadelförmige Kristalle erhalten. Diese Bedingungen wurden anschließend durch systematische Variation der Salzkonzentration, des pH-Wertes und der Proteinkonzentration weiter optimiert, sodass schließlich je nach Bedingung größere Nadeln sowie teils plattenförmige, rhombische Kristalle erhalten wurden (Abbildung 38).

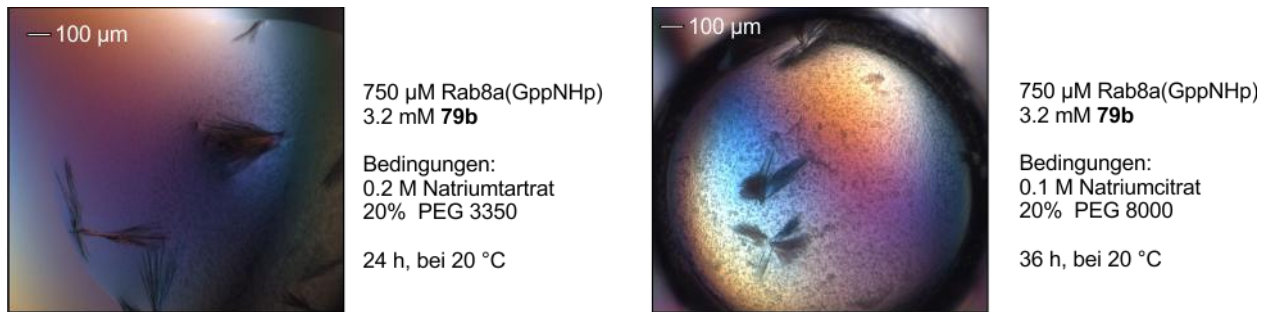


Abbildung 38. Kristallisationsversuche für Peptid **79b** und Rab8(GppNHp). Im Hochdurchsatzverfahren wurden mit der *sitting-drop*-Methode einige Kristallisationsscreens getestet. Unter einigen Bedingungen wurden dabei nadelförmige und teils rhombische Kristalle erhalten, die nach röntgenkristallographischer Untersuchung aber keine Elektronendichte von **79b** enthielten.

Die röntgenkristallographische Untersuchung der verschiedenen Kristalle ließ jedoch in allen Fällen nur eine Elektronendichte erkennen, die Rab8 zugeordnet werden konnte, während das Peptid in keinem Datensatz identifiziert wurde. Zwar kristallisierte Rab8 dabei in einer Raumgruppe, die sich von der Struktur des reinen Rab-Proteins unterschied, offenbar war das Peptid jedoch nicht in ausreichend hohem Maße oder zu flexibel gebunden, sodass keine Elektronendichte in der Kristallstruktur erkennbar war. Auch in weiteren Studien konnten keine Bedingungen identifiziert werden, die eine röntgenkristallographische Analyse des gebundenen Peptids ermöglicht hätten. Daneben wurde versucht, **79b** mit Rab8 im nukleotidfreien Zustand röntgenkristallographisch zu untersuchen. Trotz umfangreicher Studien im Hochdurchsatzverfahren konnte allerdings keinerlei Kristallbildung beobachtet werden. Dabei war die geringe Stabilität und damit verbundene geringe Löslichkeit von Rab8 für die Kristallisation hinderlich und konnte nicht erkennbar durch die Bindung von **79b** gesteigert werden.

5.4.2 Variation der Verbrückungsarchitektur

Durch das Ausbleiben kristallographischer Daten war eine strukturgestützte Verbesserung des Peptids **79** nicht möglich. Daher wurden im Folgenden systematisch eine Reihe struktureller Parameter variiert, um die Affinität zum Zielprotein Rab8(GppNHp) zu verbessern.

In einem ersten Schritt wurde die Verwendung einer anderen α -helikalen Stabilisierungsmethode untersucht. Exemplarisch wurde die Strategie des *N*-terminalen kovalenten Wasserstoffbrücken-Ersatzes (HBS)²⁰⁵ gewählt, die bereits erfolgreich für die Synthese von Ras-SOS-Inhibitoren eingesetzt wurde.⁶⁴ Peptid **90** wurde analog zu **60** (Abbildung 15) an der Festphase aufgebaut, wobei die Sequenz um ein C-terminales Lysin für die Einbringung einer Fluoreszenzmarkierung erweitert wurde. Die Ringschlussmetathese verlief quantitativ unter Verwendung von Hoveyda-Grubbs II-Katalysator und Mikrowellenbestrahlung. Nach Markierung des C-terminalen Lysins mit FITC wurde **90** erhalten und auf seine Affinität zu Rab8(GppNHp) getestet. Dabei erhöhte der Einbau des *N*-terminalen kovalenten Wasserstoffbrücken-Ersatzes zwar die Affinität im Vergleich zur Wildtypsequenz **66a**, konnte jedoch nicht die neunfache Verbesserung erzielen, die durch die α -methylierte Kohlenwasserstoffverbrückung in **79a** erreicht wurde (Abbildung 39). Eine Kombination beider Methoden war hingegen synthetisch nicht zugänglich, da sich der Makrozyklus des Wasserstoffbrückenersatzes selbst durch einen Überschuss des Katalysators, ausgedehnte Reaktionszeiten und Mikrowellenbestrahlung nicht schließen ließ.

Die Synthese kohlenwasserstoffverbrückter Peptide in der *i,i+4*-Architektur wird klassischerweise durch den Einbau zweier Bausteine vom Typ Fmoc-S₅-OH erreicht, die nach Ringschlussmetathese eine hydrophobe Verbrückung bestehend aus acht Kohlenstoffatomen erzeugen.^{77,84} Um den Einfluss dieser Kohlenwasserstoffverbrückung zu untersuchen, wurden Derivate mit kürzerem und längerem Makrozyklus sowie ein unzyklisiertes Derivat synthetisiert. Die Synthese der Peptide (**92** - **94**) erfolgte analog zu **79** durch den Einbau entsprechend seitenkettenfunktionalisierter Aminosäure-Bausteine. Im Fall von Peptid **94** wurden mittels HPLC-MS-Analyse zwei Produkte der zu erwartenden Masse identifiziert. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um *cis/trans*-Isomere, von denen allerdings nur das Hauptprodukt isoliert werden konnte. Die Verkürzung (**92**) bzw. Verlängerung (**93**) des Makrozyklus um eine Methylen-Einheit bewirkte einen Affinitätsverlust, während die Verlängerung um zwei Methylen-Einheiten (**94**) zu einem Peptid mit geringfügig erhöhter Affinität führte. Interessanterweise hat der Ringschluss des C8-Makrozyklus keinen Einfluss, sodass das unverbrückte Derivat **91** eine vergleichbare Affinität zu Rab8(GppNHp) aufweist wie **79** mit geschlossenem Makrozyklus. Allerdings wurden bereits früher Fälle beschrieben, bei denen die abschließende Makrozyklisierung der α -Alkenyl- α -methyl-Bausteine nur einen geringen Einfluss auf die Affinität oder Helizität derartiger Peptide zeigte.⁷⁷

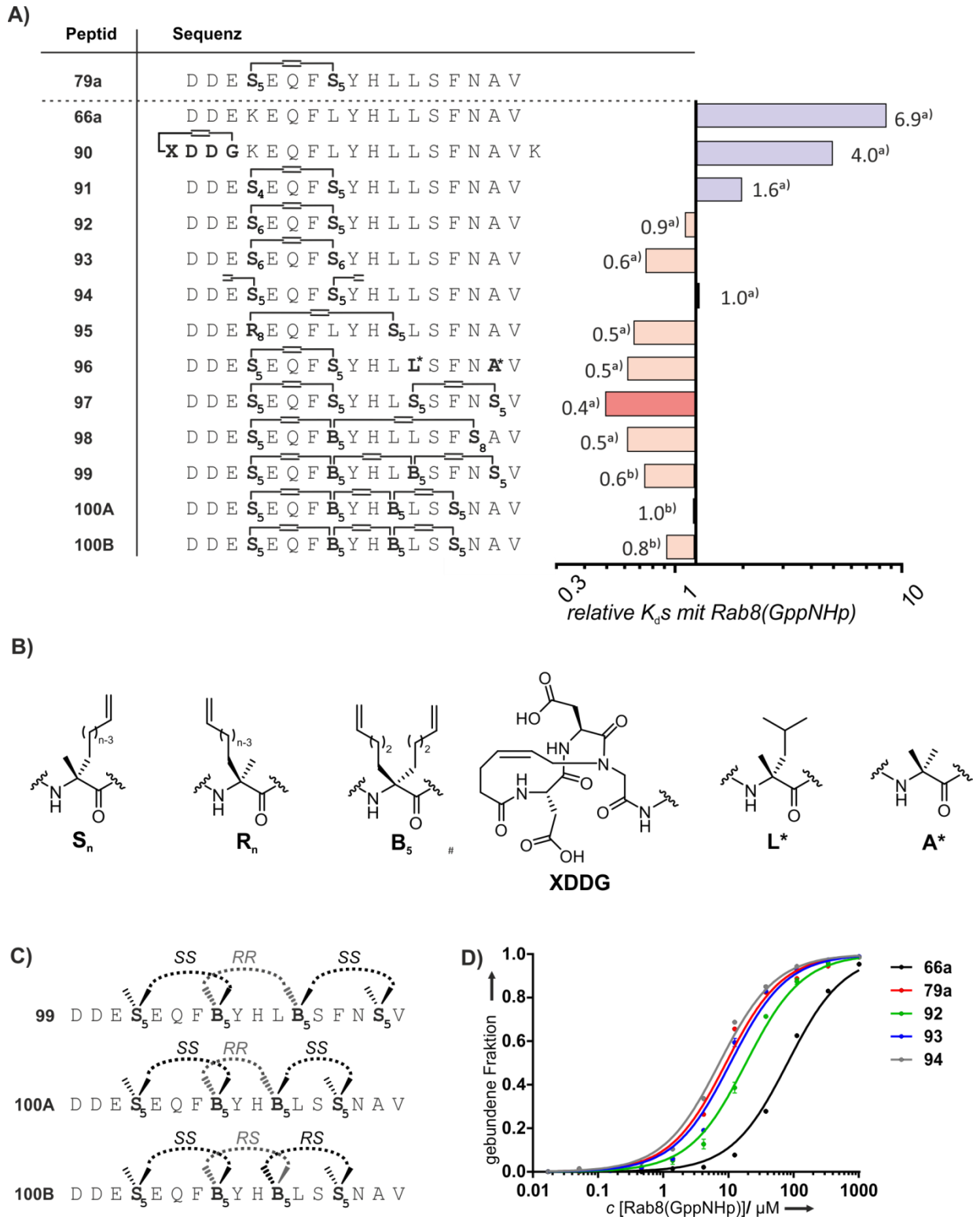


Abbildung 39. Bindungsdaten der von **79** abgeleiteten Derivate mit Rab8(GppNHp). A) Peptidsequenzen und relative Dissoziationskonstanten, die auf den K_D von **79b** normiert wurden. Verbesserte Affinitäten in rot, verschlechterte Affinitäten in blau. (Die Messungen wurden zu verschiedenen Phasen des Optimierungsprozesses durchgeführt, sodass sich etwas unterschiedliche Dissoziationskonstanten für das Referenzpeptid **79a** ergaben: $^{[a]}K_D = 11.7 \pm 0.3 \mu\text{M}$ und $^{[b]}K_D = 62.1$; $c_{\text{max}}[\text{Rab8a}(\text{GppNHp})] = 1.00 \text{ mM}$). B) Nicht-natürliche Bausteine der verschiedenen Verbrückungsarchitekturen. C) Voraussichtliche Konfigurationen der dreifach-verbrückten Derivate **99**, **100A** und **100B**. D) Repräsentative Bindungsdaten des FP-Experiments.

Als nächstes wurde eine Reihe an Derivaten mit ausgedehnter konformativer Stabilisierung synthetisiert. Die Kohlenwasserstoffverbrückung in der $i, i+7$ -Architektur verknüpft zwei Windungen einer α -Helix und wurde durch den Einbau der Aminosäuren Fmoc- R_8 -OH und Fmoc- S_5 -OH erhalten (**95**). Des Weiteren wurde die Einbringung zusätzlicher α -methylierter Aminosäuren untersucht (vgl. Abschnitt 2.3). Dazu wurden die kommerziell verfügbare Fmoc- α -Aminoisobuttersäure (**A***) und Fmoc- α -Methyleucin (**L***, **102**) im Abstand $i+4$ und $i+8$ zur Kohlenwasserstoffverbrückung die Sequenz eingebracht (**97**). Der Fmoc- α -Methyleucin-Baustein wurde dabei analog zu dem in Abbildung 13 dargestellten Syntheschema durch Alkylierung des chiralen Ni(II)-Komplexes **36** mit Isobutylbromid erhalten.

Als nächstes wurde die gleichzeitige Einbringung zweier Kohlenwasserstoffverbrückungen der $i, i+4$ -Architektur in die Peptidsequenz untersucht (**96**). Diese Strategie wurde bereits für die Stabilisierung ausgedehnter Peptidsequenzen, wie beispielsweise bei einem 37-mer HIV-Fusions-Inhibitor, eingesetzt.⁸⁵ Dabei waren die beiden $i, i+4$ -Verbrückungen in einem großen Abstand (19 Reste) in der Peptidsequenz platziert, um eine mögliche Kreuzreaktivität während der Metathesereaktion zu vermeiden. Im Fall von **96** befinden sich die beiden $i, i+4$ -Paare jedoch in einem Abstand von drei Resten zueinander. Doch trotz des daraus resultierenden zentralen $S_{i, i+4}S$ -Motivs wurden keine Nebenprodukte mit nur einem Ringschluss beobachtet. Nach Synthese des linearen Peptids erfolgte die gleichzeitige Ringschlussmetathese beider Verbrückungen und lieferte unter den gängigen Reaktionsbedingungen quantitativ das zweifach verbrückte Derivat. Darüber hinaus wurde der Einbau zweier direkt verknüpfter Kohlenwasserstoffverbrückungen untersucht (**98**). Für den Aufbau dieser vor Kurzem beschriebenen *stitched*-Architektur⁸⁶ wurden zwei α -Methyl, α -alkenyl-Bausteine in den Positionen i und $i+4+7$ sowie ein zentraler Bisalkenyl-Baustein (**B₅**) in der Position $i, i+4$ in die Sequenz eingebracht. Dabei erforderte der Einbau des sterisch anspruchsvollen Bisalkenyl-Bausteins sowie die Kupplung der folgenden Aminosäure ausgedehnte Reaktionszeiten und Mehrfachkupplungen. Die abschließende Ringschlussmetathese lieferte unter Verwendung von Grubbs I-Katalysator quantitativ den geschlossenen spiro-Bizyklus. Auf dieser Architektur aufbauend wurden schließlich noch zwei Derivate mit drei direkt benachbarten Kohlenwasserstoffverbrückungen generiert. Dazu wurden nicht-natürliche Aminosäuren in den Positionen $i, i+4, i+4+3$ und $i+4+3+3$ (**99**) sowie $i, i+4, i+4+4$ und $i+4+4+4$ (**100**) der Peptidsequenz eingebracht. Im Fall von **99** verlief die gleichzeitige Ringschlussmetathese aller drei Verbrückungen quantitativ unter Standardbedingungen und lieferte ein einziges der vier möglichen Diastereomere, was auf eine deutlich bevorzugte Geometrie hindeutet. Im Fall von **100**

hingegen erforderte die Metathesereaktion ausgedehnte Reaktionszeiten sowie den Einsatz von Grubbs II-Katalysator, wobei zwei der vier möglichen Diastereomere erhalten wurden (**100A/B**). Aufgrund der geringen erhaltenen Produktmengen konnte leider keine Zuordnung der Stereoisomere erfolgen. Allerdings wurden in früheren Studien bevorzugte Konfigurationen der α -Alkenyl-funktionalisierten Bausteine für die $i, i+4$ - bzw. $i, i+3$ -Architektur ermittelt, die eine Abschätzung erlauben (Kapitel 2.4). Für die $i, i+4$ -Architektur ermittelten Verdine und Mitarbeiter einen Makrozyklus bestehend aus acht Kohlenstoffatomen und die Konfigurationen $R_{i, i+4}R$ und $S_{i, i+4}S$ als bevorzugte Geometrie, während für die Konfigurationen $R_{i, i+4}S$ bzw. $S_{i, i+4}R$ kein Ringschluss beobachtet wurde.⁷⁷ Im Fall der $i, i+3$ -Architektur sind insbesondere die Kombinationen $R_{i, i+3}S$ und $R_{i, i+3}R$ bevorzugt, während $S_{i, i+3}S$ und $S_{i, i+3}R$ eine weniger günstige Geometrie darstellen.⁸² Daraus ergeben sich voraussichtlich die in Abbildung 39C dargestellten Diastereomere.

Alle Derivate mit ausgedehnter konformativer Stabilisierung (**95 – 100**) zeigten im Vergleich zum Ausgangspeptid leicht erhöhte Affinität zu Rab8(GppNHp) und unterscheiden sich bis auf **100A** nur geringfügig voneinander. Der deutlichste Affinitätsgewinn (Faktor 2.5) wurde dabei für Peptid **97** mit zwei Kohlenwasserstoffverbrückungen der $i, i+4$ -Architektur erhalten. Interessanterweise bewirkte der Ringschluss eines dritten Makrozyklus in **99** einen gewissen Affinitätsverlust im Vergleich zu **97**. Möglicherweise verhindert die rigidere Struktur die Ausbildung der bioaktiveren Konformation. Auch sind sterische Hinderungen zwischen dem dritten Makrozyklus und der Rab8-Proteinoberfläche nicht auszuschließen. Ein genaues Verständnis des Bindungsverhaltens der unterschiedlichen Peptide würde allerdings die Analyse struktureller Daten erfordern. Obwohl die Affinitätsgewinne vergleichsweise moderat ausfallen, zeigten einige zusätzlich stabilisierte Derivate in der Vergangenheit teils deutlich verbesserte pharmakologische Eigenschaften, wie verbesserte Proteasestabilität und erhöhte Zellgängigkeit, und eignen sich daher als Ausgangspunkt für die Synthese weiter verbesserter Derivate.⁸⁶

6 Zusammenfassung

Kleine GTPasen sind eine Klasse GDP-/GTP-regulierter Schalterproteine, die in ein Netzwerk aus zahlreichen Protein-Protein-Interaktionen (PPIs) involviert sind und dadurch eine Vielzahl wichtiger zellulärer Prozesse regulieren. Mitglieder dieser Proteinklasse gelten seit langer Zeit als pharmakologisch unzugänglich, da ihre Wechselwirkungen über ausgedehnte und flache Interaktionsflächen vermittelt werden. Dies gestaltet eine Entwicklung und Anwendung traditioneller niedermolekularer Inhibitoren äußerst schwierig.

Die prominentesten Vertreter kleiner GTPasen sind Ras-Proteine, die eine Schlüsselrolle bei der Kontrolle von Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Zellüberleben einnehmen. Fehlfunktionen in der Ras-vermittelten Signalweiterleitung können dramatische Folgen haben. So sind mutierte Ras-Proteine seit nunmehr 50 Jahren als wesentliche Auslöser menschlicher Krebserkrankungen bekannt. Doch trotz intensiver Forschungsbemühungen und vielversprechender Ansätze existieren bisher keine Moleküle, die dazu in der Lage sind, direkt die Signalwirkung von Ras wirksam zu modulieren. Eine weitere Unterfamilie der kleinen GTPasen sind Rab-Proteine, die von zentraler Bedeutung für die Kontrolle des zellulären Membrantransports sind. Dies beinhaltet Funktionen wie die Vesikelbildung an der Donormembran, das Sortieren des Transportguts, die Translokalisierung von Vesikeln am Zytoskelett, sowie die Fusion mit der Zielmembran. Rab-GTPasen wurden in den vergangenen Jahren ebenfalls zunehmend mit der Entstehung und Entwicklung verschiedener humaner Erkrankungen in Verbindung gebracht, sodass sie mittlerweile als attraktive therapeutische Zielproteine angesehen werden. Doch auch für Rab-GTPasen waren bisher keine Verbindungen bekannt, die direkt an die Proteine binden und ihre PPIs modulieren können.

Aufbauend auf Fortschritten bei der Adressierung schwer zugänglicher PPIs, wurden in dieser Arbeit Peptid-basierte Modulatoren für PPIs kleiner GTPasen generiert. Dazu wurden in Strukturdaten von Bindungsepitopen natürlicher Interaktionspartner systematisch Sekundärelemente identifiziert, die einen wesentlichen Anteil zur Wechselwirkung beitragen. Geeignete Kandidaten wurden durch Einbau chemischer Modifikationen stabilisiert und auf ihr Bindungsverhalten getestet. Im Fall der Ras Proteine wurde die α H-Helix des GEFs SOS durch α -methylierte Kohlenwasserstoffverbrückung („Peptide Stapling“) stabilisiert. In Ras-Effektor-Komplexen wurden diverse β -Faltblätter identifiziert, von denen die β 1/ β 2-Haarnadel der c-Raf-RBD ausgewählt und mittels Makrozyklisierung und kovalente, intramolekulare Verbrückungen

stabilisiert wurde. Viele der modifizierten Peptide zeigten im FP-Bindungsexperiment zwar ein verbessertes Bindungsverhalten, allerdings waren die Affinitäten der jeweiligen Startsequenzen sehr gering ($K_D > 300 \mu\text{M}$) und kamen daher nicht als PPI Inhibitoren bzw. für eine weitergehende Optimierung in Frage. Um potentiell eine Verbindung mit artifizieller GAP-Aktivität zu generieren, wurden schließlich kohlenwasserstoffverbrückte Derivate einer α -Helix aus Rap1GAP synthetisiert, da in Ras-spezifischen GAPs keine für eine Stabilisierung geeigneten Sekundärstrukturen identifiziert werden konnten. Obwohl Rap- und Ras-Proteine strukturell eng verwandt sind, konnte jedoch für keines der Peptide eine nennenswerte Affinität zu H-Ras festgestellt werden.

In einer breit angelegten Machbarkeitsstudie wurde eine analoge Strategie auf Rab-Proteine, die größte Unterfamilie kleiner GTPasen, angewendet. Für Rab-GTPasen wurde in verschiedenen Klassen von Interaktionspartnern eine Vielzahl von α -helikalen Bindungsepitopen identifiziert. Eine Auswahl dieser Peptidsequenzen wurde synthetisiert und zeigte keine Bindung zu nukleotidgebundenen Rab-Proteinen. Dagegen banden einige Peptide mit niedrigen mikromolaren Dissoziationskonstanten ($K_D < 20 \mu\text{M}$) an verschiedene nukleotidfreie Rab-Proteine. Vier der Peptide wurden mittels α -methylierter Kohlenwasserstoffverbrückung stabilisiert und ebenfalls auf ihre Bindung zu Rab-Proteinen untersucht. Der Einbau der Kohlenwasserstoffverbrückung erhöht dabei die Affinität für Rab-Proteine in nahezu allen untersuchten Fällen. So bewirkte der Einbau der Verbrückung in einem Beispiel eine mehr als 200-fach erhöhte Bindungsaffinität im Vergleich zum Ursprungspeptid. Die intensivste Bindung zeigten die Peptide **79** ($K_D = 0.4 \mu\text{M}$ mit Rab8(NF)) und **85** ($K_D = 0.4 \mu\text{M}$ mit Rab11(NF)) (Abbildung 40). Sie erreichten sogar submikromolare Dissoziationskonstanten. Obwohl das Affinitätsprofil vieler Peptide dem von Nukleotidaustauschfaktoren ähnelt, konnte weder ein Einfluss auf die intrinsische Nukleotidaustauschrate noch auf den GEF-vermittelten Nukleotidaustausch nachgewiesen werden.

Auch wenn zumeist keine nennenswerte Affinität zu nukleotidgebundenen Rab-GTPasen gefunden wurde, konnten mehrere Peptide identifiziert werden, die selektiv mit Rab8a in seiner aktiven, GppNHp-gebundenen Form assoziieren. Das Peptid **79** weist dabei eine zu Rab-Effektorproteinen vergleichbare Affinität auf und zeigte funktionelle Aktivität *in vitro* durch die Inhibition einer Rab8a-Effektor-Interaktion. Dieses Peptid stellt die erste Verbindung dar, die direkt an Rab-GTPasen bindet und eine Rab-Protein-Interaktion unterdrücken kann. Durch Variation der Kohlenwasserstoffverbrückung und Einbau anderer Verbrückungsarchitekturen wurde daher anschließend versucht, die Affinität zum Zielprotein Rab8(GppNHp) weiter zu verbessern. Die

meisten Derivate zeigten einen geringen Affinitätszuwachs, wobei im besten Fall (**97**) durch den Einbau einer zusätzlichen, C-terminalen α -methylierten Kohlenwasserstoffverbrückung eine Affinitätssteigerung um ca. Faktor 2.5 erreicht wurde. Eine strukturbasierte Optimierung war hingegen nicht möglich, da für keines der Peptide die Kristallisation eines Peptid–Rab8(GppNHp)-Komplexes gelang.

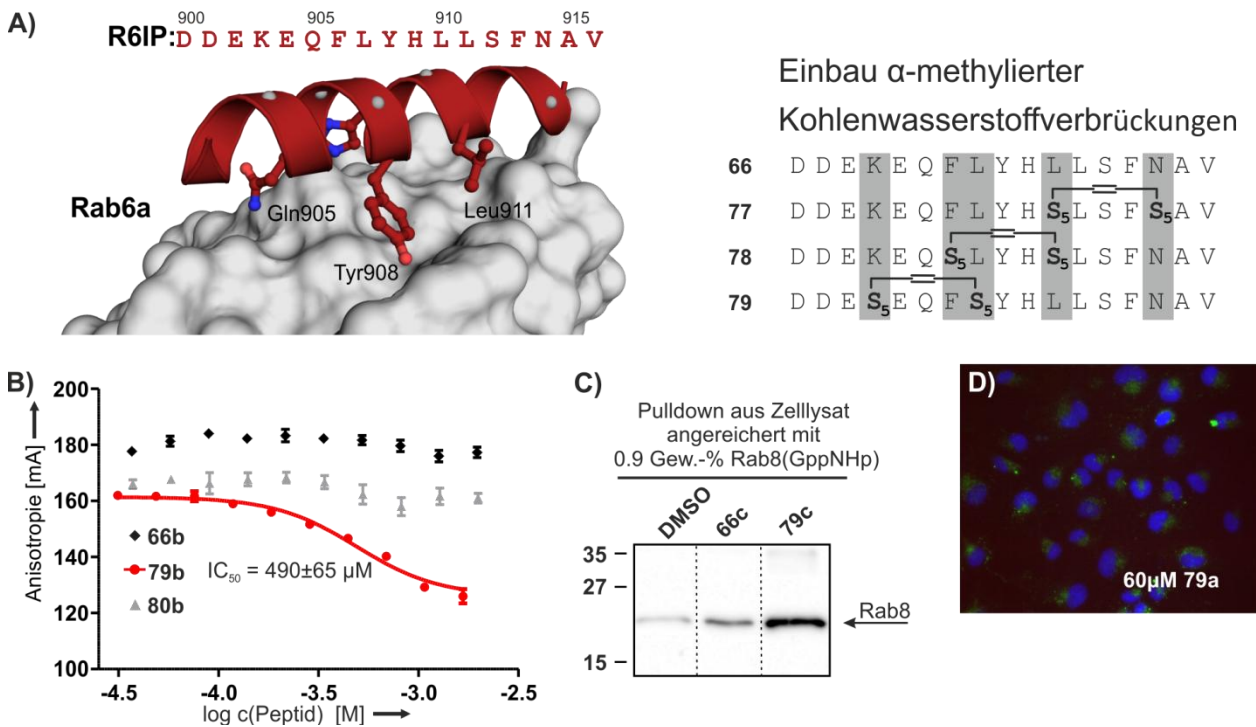


Abbildung 40. Direkte Adressierung von Rab PPIs mit Hilfe stabilisierter Bindungsepitope. A) Anhand von Kristallstrukturdaten wurden in den Bindungsdomänen von Rab-Bindungspartnern diverse α -Helices identifiziert und durch den Einbau α -methylierter Kohlenwasserstoffverbrückungen stabilisiert. Einige der Peptide waren dazu in der Lage die GppNHp-gebundene Form von Rab8a mit Dissoziationskonstanten im niedrigen mikromolaren Bereich zu binden. Der stärkste Binder, Peptid **79**, inhibierte zudem eine Rab8a-Effektor-Wechselwirkung (B) und assoziierte mit Rab8a in Zelllysate. D) Die zelluläre Aufnahme des Peptids war dabei allerdings relativ begrenzt.²⁹⁴

Durch die Stabilisierung von Bindungsepitopen natürlicher Bindungspartner konnten in dieser Arbeit erstmals Verbindungen generiert werden, die dazu in der Lage sind, eine Rab–Effektor-Wechselwirkung zu modulieren. Obwohl die vorgestellte Strategie für viele untersuchte PPIs von Rab- und Ras–GTPasen keine wirksamen Modulatoren hervorbrachte, bestand die wesentliche Limitierung in der geringen Affinität der verwendeten Ausgangssequenzen. Allerdings existieren in der Superfamilie kleiner GTPasen noch zahlreiche andere potentiell vielversprechende Ausgangssequenzen. Zudem liefert die stetig fortschreitende strukturelle und biophysikalische Charakterisierung weiterer GTPase-Protein-Komplexe möglicherweise neue Ansatzpunkte, die für die Generierung peptidbasierter Modulatoren von kleinen GTPasen genutzt werden können.

7 Experimentaltteil

7.1 Material und Geräte chemischer Experimente

Die verwendeten **Reagenzien** und **Lösungsmittel** wurden von den Firmen *Acros Organics*, *Aldrich*, *Alfa Aesar*, *Fisher Scientific*, *Merck*, oder *Sigma Aldrich* bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Wasserfreie Lösungsmittel wurden in der Qualitätsstufe „*anhydrous*“ bezogen oder nach gängigen Methoden absolutiert. DMF und DCM zur Peptidsynthese wurden von der Firma *Biosolve* erworben.

Falls nicht selbst hergestellt, wurden **geschützte Aminosäuren** und **Kupplungsreagenzien** von den Firmen *Carl Roth GmbH*, *Iris Biochtech*, *Novabiochem*, *Okeanos* bezogen.

Das für die Festphasensynthese verwendete **Harz** (NovaSyn TGR-Harz und Rink Amid MBHA (mesh 100-200)) wurde von der Firma *Novabiochem* bezogen.

Die **Festphasensynthesen** wurden in Polypropylen-Spritzenreaktoren (2, 5, 10 und 20 mL) bestückt mit Polyethylen-Fritten der Firma *Multisyntech* durchgeführt.

Die **Kreuzmetathese** wurde in Spritzenreaktoren auf einem VacMan-Manifold (*Promega*) ausgestattet mit Zweiwegehähnen für Vacuum und Argonstrom durchgeführt.

Für die **Dünnschichtchromatographie** wurden DC-Folien der Firma *Merck* (Kieselgel 60, F₂₅₄, Schichtdicke 0.2 mm) angefertigt. Die Detektion erfolgte durch UV-Licht ($\lambda = 254$ nm) oder mittels Kaliumpermanganat-basierte Färbelösung (1.6 g KMnO₄, 10 g K₂CO₃, 2.5 mL 5%-ige NaOH, 200 mL Wasser).

Die **säulenchromatographischen Reinigungen** (*Flash-Chromatographie*) wurden an Kieselgel der Firma *Acros Organics* (40 – 65 μ m, 230 – 400 mesh) mit einem Überdruck von 0.2 – 0.5 bar) durchgeführt.

Die ¹H- und ¹³C-**NMR-Spektren** wurden an Geräten der Firma *Bruker* AMX 400 MHz, AMX 500 MHz und AMX 600 MHz und der Firma *Varian* Mercury 400 MHz bei 300 K in deutierten Lösungsmitteln aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen sind in [ppm] (bezogen auf Tetramethylsilan,

TMS) angegeben und auf das Restsignal des jeweiligen Lösungsmittels kalibriert: DMSO- d_6 ($\delta = 2.50$ ppm (^1H) bzw. ($\delta = 39.51$ ppm (^{13}C)) und CDCl_3 ($\delta = 7.24$ ppm (^1H) bzw. ($\delta = 77.23$ ppm (^{13}C)). Die Signalmultiplizitäten sind abgekürzt angegeben: s = Singulett, d = Dublett, dd = doppeltes Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, b = breites Signal. Die Angabe der Kopplungskonstanten J erfolgt in Hertz [Hz].

Hochaufgelöste Massenspektren (HRMS) wurden mittels ESI (*electro spray ionisation*) an einem LTQ Orbitrap Spektrometer der Firma *Thermo Scientific* aufgenommen, das mit einem *Accela* HPLC-System gekoppelt war. Die Injektion erfolgte mittels *Flow Injection* mit einer Flussrate von 250 $\mu\text{L}/\text{min}$. Als Lösungsmittel kam ein Gemisch (1:1) aus Wasser + 0.1% Ameisensäure und Acetonitril + 0.1% Ameisensäure zum Einsatz.

Analytische Umkehrphasen-HPLC (analyt. HPLC) erfolgte an einem Agilent Series 1100/LC/MSD VL (*Agilent*) mit einer Nucleodur CC125/3 C18-Säule (*Macherey Nagel*). Das System wurden unter Verwendung linearer Gradientenprofile von Laufmittel A (Wasser + 0.1% Trifluoressigsäure) und Laufmittel B (Acetonitril + 1% Trifluoressigsäure) bei einer Flussrate von 0.5 mL/min über 30 min betrieben. Die UV-Detektion erfolgte bei 210 nm, 254 nm und 280 nm.

Analytische Umkehrphasen-HPLC-Massenspektren (analyt. HPLC-MS) erfolgte an einem Agilent Series 1100 (*Agilent*) mit Säulen der Firma *Macherey & Nagel* (Nucleodur CC 125/4 C18-Säule und CC 125/4 C4-Säule). Die Massendetektion erfolgte mit einem Gerät der Firma *Thermo Fisher* (LCQ Advantage MAX). Die Ionisierung erfolgte mittels ESI (*electro spray ionization*). Parallel erfolgte eine UV-Detektion bei 210 nm, 254 nm und 280 nm sowie eine Corona-Detektion. Als Eluent kamen Laufmittelgemische aus Laufmittel A (Wasser + 0.1% Ameisensäure) und Laufmittel B (Acetonitril + 1% Ameisensäure) im linearen Gradientenbetrieb zum Einsatz. Die Flussrate betrug 1 mL/min. Zur Reaktionskontrolle wurden zudem **U-HPLC**-Messungen an einem Agilent 1290 Infinity LC-System (*Agilent*) mit einer Acquity UPLC BEH C18-Säule (*Waters*) durchgeführt.

Die Aufreinigung mittels **präparativer Umkehrphasen-HPLC (präp. HPLC)** erfolgte an einem Agilent Series 1100/LC/MSD VL (*Agilent*) unter Verwendung einer Nucleodur CC 125/10 C18-Säule von *Macherey & Nagel*. Die Ionisierung erfolgte mittels ESI (*electro spray ionization*). Die

Massendetektion erfolgte mit einem LCQ Advantage MAX (*Thermo Fisher*) bei paralleler UV-Detektion bei 210 nm, 254 nm und 280 nm.

Die Enantiomerenreinheit wurde mittels **chiraler HPLC** Analyse an einem System Firma Agilent (1100 Series) und einer Säule mit chiraler stationärer Phase (CHIRALCEL IA) durchgeführt. Die UV-Detektion erfolgte bei 210 nm, 254 nm und 280 nm.

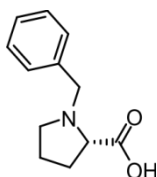
Für die **Mikrowellen-unterstützte Peptidsynthese** wurde ein Liberty-12 Channel Automated Peptide Synthesizer der Firma *CEM* eingesetzt. Der Discovery-Mikrowellenreaktor wurde in Single-Mode Technik betrieben, wobei die Temperaturkontrolle durch einen faseroptischen Sensor erfolgte.

Circular Dichroismus (CD)-Spektren wurden an einem *Jasco* J815 CD-Spektrometer in einer Quarzküvette der Weglänge 0.1 cm bei 25°C aufgenommen.

Die Konzentrationsbestimmung fluoreszenz-markierter Peptide erfolgte mittels **Absorptionsmessung** an einem Infinite M200 (*Tecan*) und einem Nanodrop 2000c (*Thermo Scientific*).

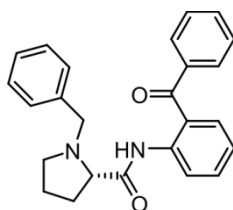
7.2 Bausteinsynthese

Synthese von L-N-Benzylprolin (34)



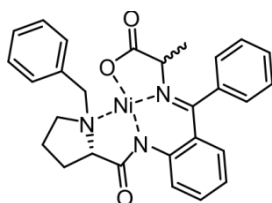
Zu einer Lösung von L-Prolin (26.5 g, 230 mmol) und Natriummethanolat (24.9 g, 460 mmol, 2.0 eq) in 230 mL Methanol wurde Benzylchlorid (26.7 mL, 232 mmol, 1.1 eq) portionsweise über 30 min zugegeben und die Reaktionsmischung wurde für 60 h bei 50 °C gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde die Suspension mit konz. HCl (19.1 mL) neutralisiert, 230 mL Chloroform zugegeben und für weitere 1.5 h gerührt. Der weiße Niederschlag wurde abfiltriert und mit 3× 50 mL Chloroform gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden unter vermindertem Druck stark eingengt und das Produkt in kaltem Aceton ausgefällt, abfiltriert und im Hochvakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Das Produkt wird als weißer Feststoff erhalten (40.3 g, 197 mmol, 85%).

¹H-NMR (500 MHz, DMSO- D_6): δ = 7.39 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 7.34 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 7.29 (dd, J = 8.4, 5.9 Hz, 1H), 4.08 (d, J = 13.0 Hz, 1H), 3.76 (d, J = 13.0 Hz, 1H), 3.34 (dd, J = 8.9, 5.8 Hz, 1H), 3.17 - 2.97 (m, 1H), 2.60 (dd, J = 17.3, 8.6 Hz, 1H), 2.10 (dq, J = 12.7, 8.4 Hz, 1H), 1.87 (ddd, J = 12.9, 10.0, 5.2 Hz, 1H), 1.78 (dtd, J = 16.2, 8.2, 4.2 Hz, 1H), 1.74 - 1.65 (m, 1H). **¹³C-NMR** (126 MHz, DMSO): δ = 172.3, 136.2, 129.2, 128.2, 127.6, 65.8, 57.2, 52.8, 28.5, 22.7. **HRMS**: berechnet für $C_{12}H_{15}NO_2$: = 206.1176 [m+H]⁺; gefunden 206.1181 [m+H]⁺. **HPLC**: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 13 min) = 6.22 min.

Synthese von L-[N-(N'-Benzylpropyl)amino]benzophenonhydrochlorid (35)

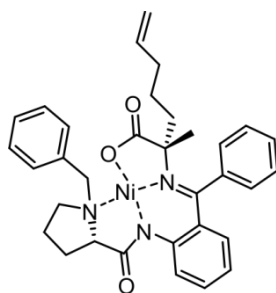
Zu einer Suspension aus **34** (40.3 g, 197 mmol) und *N*-Methylimidazol (37.2 g, 453 mmol, 2.3 eq) in 250 mL Dichlormethan wurde Mesylchlorid (15.3 mL, 197 mmol, 1.0 eq) bei 0 °C portionsweise zutropft. Zur orange-braunen Lösung wurde anschließend 2-Aminobenzophenon (35.0 g, 177 mmol, 0.9 eq) in 300 mL Dichlormethan zugegeben und die Reaktionsmischung für 20 h refluxiert. Nach Zugabe von ges. Ammoniumsulfat-Lösung wurde die wässrige Phase mit Dichlormethan extrahiert (3 × 40 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck vollständig entfernt und das Rohprodukt als rot-brauner Feststoff erhalten. Dieser wurde in 200 mL Aceton gelöst, durch portionsweise Zugabe von konz. Salzsäure (32.6 mL, 354 mmol, 2 eq) ausgefällt, abfiltriert und mit Aceton gewaschen. Das Produkt wird in Form eines weißen Feststoffs im Hochvakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und ohne weitere Reinigung verwendet (42.4 g, 110 mmol, 56%).

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-D₆): δ = 11.34 (s, 1H), 9.76 (s, 1H), 7.68 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.60 (ddd, J = 15.4, 11.4, 4.5 Hz, 2H), 7.50 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 7.47 - 7.41 (m, 2H), 7.36 (tt, J = 15.2, 7.7 Hz, 6H), 7.26 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 4.35 (dd, J = 16.5, 8.2 Hz, 1H), 4.25 (ddd, J = 30.3, 12.2, 5.0 Hz, 2H), 3.46 - 3.35 (m, 1H), 3.32 - 3.15 (m, 1H), 2.22 (td, J = 16.2, 8.4 Hz, 1H), 1.95 (dd, J = 7.9, 4.0 Hz, 1H), 1.72 - 1.55 (m, 1H), 1.28 (td, J = 13.5, 8.4 Hz, 1H). ¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-D₆): δ = 194.1, 165.7, 136.6, 136.6, 134.1, 132.9, 132.2, 131.4, 131.0, 130.0, 129.6, 129.4, 128.6, 128.4, 125.5, 124.3, 65.7, 56.6, 54.1, 27.8, 22.1. **HRMS**: berechnet für C₂₅H₂₄N₂O₂: = 385.1911 [m+H]⁺; gefunden 385.1910 [m+H]⁺. **HPLC**: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 13 min) = 6.22 min.

Synthese von Ala-Ni(II)-BPB (36)

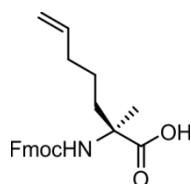
Eine Lösung aus **35** (50.4 g, 120 mmol), D/L-Alanin (21.3 g, 240 mmol, 2 eq) und Nickel(II)-nitrat gegeben in 450 mL Methanol wird für 30 min bei 50 °C gerührt, mit einer Lösung von Kaliumhydroxid (53.6 g, 960 mmol, 8 eq) in 200 mL Methanol versetzt und für 1.5h refluxiert. Nach Abkühlen auf RT wird Essigsäure (48 mL, 840 mmol, 7 eq) zugegeben und das Rohprodukt durch Zugabe von 1 L Wasser ausgefällt. Der rote Niederschlag wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen und am Hochvakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Das Produkt wird in Form roter Kristalle erhalten und kann ohne weitere Reinigung eingesetzt werden.

¹H NMR (500 MHz, DMSO- D_6): δ = 8.35 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.96 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.58 (dt, J = 21.8, 7.2 Hz, 1H), 7.50 (dd, J = 14.8, 7.4 Hz, 1H), 7.36 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.15 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 7.11 - 7.05 (m, 1H), 6.68 (dt, J = 15.0, 7.5 Hz, 1H), 6.52 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 4.06 (d, J = 12.3 Hz, 1H), 3.65 - 3.44 (m, 2H), 3.43 - 3.33 (m, 1H), 2.47 - 2.38 (m, 1H), 2.24 - 2.13 (m, J = 16.4, 6.3 Hz, 1H), 1.44 (d, J = 7.0 Hz, 1H). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO- D_6): δ = 180.2, 178.3, 169.4, 142.2, 134.7, 133.4, 132.5, 131.4, 131.1, 129.5, 128.8, 128.7, 128.5, 128.28, 127.6, 127.3, 125.7, 123.32, 120.0, 69.5, 65.9, 62.5, 57.5, 30.4, 23.7, 21.3. Rf: 0.32 (EtOAc/Pentan, 1/5, v/v). **HRMS**: berechnet für $C_{28}H_{27}N_3NiO_3$: 512.1479 [m+H]⁺; gefunden 512.1453 [m+H]⁺. **HPLC**: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 13 min) = 7.39 min.

Synthese von BPB-Ni(II)-2-methylhept-6-enoat (37)

Zu einer Lösung von **36** (2.57 g, 5.00 mmol) in trockenem DMF (25 mL) wurde unter Argon frisch gemahlenes Kaliumhydroxid geben (2.80 g, 50.0 mmol, 10 eq) und für 20 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde 5-Bromopent-1-en (940 mg, 6.00 mmol, 1.2 eq) portionsweise zugetropft und das Reaktionsgemisch nach Erwärmen auf RT für weitere 2h gerührt. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck vollständig entfernt und das Produkt nach Koevaporation mit Toluol als roter Feststoff (2.82 g, 4.74 mmol, 95%) erhalten.

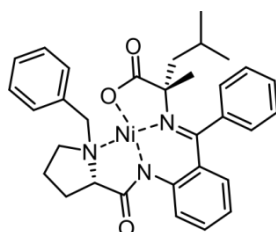
¹H NMR (400 MHz, DMSO- D_6): δ = 8.36 – 8.29 (m, 2H), 7.87 (dd, J = 8.6, 1.1 Hz, 1H), 7.58 – 7.48 (m, 3H), 7.48 – 7.37 (m, 3H), 7.28 – 7.22 (m, 1H), 7.15 – 7.05 (m, 2H), 6.67 – 6.60 (m, 1H), 6.57 (dd, J = 8.4, 1.6 Hz, 1H), 5.89 (ddt, J = 17.0, 10.3, 6.7 Hz, 1H), 5.13 – 4.96 (m, 2H), 4.07 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 3.69 (d, J = 12.3 Hz, 1H), 3.51 (dd, J = 10.0, 6.6 Hz, 1H), 3.40 – 3.34 (m, 1H), 3.10 – 2.94 (m, 1H), 2.47 – 2.35 (m, 3H), 2.18 – 2.00 (m, 4H), 1.97 – 1.83 (m, 1H), 1.59 – 1.42 (m, 2H), 1.04 (s, 3H). **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO- D_6): δ = 181.17, 180.70, 172.38, 169.23, 142.42, 138.93, 136.99, 135.42, 133.51, 132.18, 131.46, 131.16, 130.01, 129.21, 129.15, 128.56, 128.53, 127.93, 127.64, 124.22, 120.69, 115.87, 77.44, 70.31, 63.60, 57.68, 33.87, 30.89, 29.61, 25.28, 23.51. **HRMS**: berechnet für $C_{33}H_{36}N_3NiO_3$: 580.2105 [m+H]⁺; gefunden 580.2119 [m+H]⁺. **HPLC**: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 13 min) = 9.33 min.

Synthese von (S)-2-2-((9H-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonylamino-2-methylhept-6-ensäure [Fmoc-S5-OH] (32)


Eine Lösung von **37** (2.20 g, 3.70 mmol) in 40 mL MeOH/HCl_{aq.} (3N) (1/1, v/v) wurde für 1 h refluxiert. Das Lösungsmittel der grünen Suspension wurde vollständig unter vermindertem Druck entfernt und der grüne Rückstand in 100 mL Dioxan/Wasser (1/1, v/v) aufgenommen. Die Lösung wurde mit gesättigter Natriumcarbonatlösung auf pH 7 eingestellt und anschließend Natriumcarbonat (1.60 g, 14.8 mmol, 4 eq) sowie Fmoc-OSu (1.83 g, 5.55 mmol, 1.5 eq; sowie weiteren 2 × je 0.5 eq nach 3 d und 5 d) zugegeben und die Suspension bei RT für 7 d gerührt. Nach Zugabe von 100 mL Wasser wurde mit wässriger HCl (3N) der pH-Wert der Lösung auf pH 2 eingestellt und anschließend mit Dichlormethan (3 × 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck vollständig entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie ($R_f = 0.31$, MeOH/DCM, 5/95, v/v) an Kieselgel isoliert und als weißer Feststoff erhalten (0.88 g, 2.33 mmol, 63%).

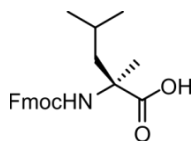
¹H NMR (400 MHz, DMSO) $\delta = 12.35$ (s, 1H), 7.89 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.72 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.42 – 7.38 (m, 2H), 7.35 – 7.28 (m, 2H), 5.88 – 5.65 (m, 1H), 5.08 – 4.87 (m, 2H), 4.35 – 4.11 (m, 3H), 2.07 – 1.90 (m, 2H), 1.86 – 1.72 (m, 1H), 1.72 – 1.58 (m, 1H), 1.38 – 1.23 (m, 5H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO) $\delta = 176.01, 155.44, 144.52, 141.37, 139.15, 128.28, 127.71, 125.92, 120.74, 115.56, 65.91, 58.92, 47.41, 36.89, 33.94, 23.21, 23.06$. HRMS: berechnet für C₂₃H₂₆NO₄ = 380.1856 [m+H]⁺; gefunden 380.1862 [m+H]⁺. HPLC: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 13 min) = 9.72 min. EE: >97%

Synthese von BPB-Ni(II)-2-methyl-isocapronat (101)

Zu einer Lösung von **36** (4.11 g, 8.00 mmol) in trockenem DMF (30 mL) wurde unter Argon frisch gemahlene Kaliumhydroxid gegeben (4.50 g, 80.0 mmol, 10 eq) und für 20 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde Isobutylbromid (1.39 g, 9.60 mmol, 1.2 eq) portionsweise zugetropft und das Reaktionsgemisch nach Erwärmen auf RT für weitere 1.5 h gerührt. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt nach Koevaporation mit Toluol als roter Feststoff (4.23 g, 7.40 mmol, 92%) erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO) δ = 8.08 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.72 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.51 – 7.43 (m, 1H), 7.38 (dd, J = 15.9, 8.2 Hz, 1H), 7.26 – 7.21 (m, 1H), 7.20 – 7.14 (m, 1H), 7.14 – 7.08 (m, 1H), 7.08 – 7.00 (m, 1H), 6.66 – 6.53 (m, 1H), 4.47 (d, J = 12.7 Hz, 1H), 3.70 (d, J = 12.7 Hz, 1H), 3.45 (dd, J = 10.6, 6.1 Hz, 1H), 3.26 – 3.10 (m, 1H), 2.52 – 2.37 (m, 1H), 2.10 – 2.01 (m, 1H), 1.71 – 1.63 (m, 1H), 1.27 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 1.21 (s, 1H), 1.14 (d, J = 6.7 Hz, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO) δ = 182.98, 180.72, 172.47, 141.86, 136.89, 133.69, 133.64, 131.83, 131.74, 130.60, 130.20, 129.47, 129.12, 129.01, 128.52, 127.93, 127.91, 127.03, 123.89, 120.74, 70.36, 63.75, 57.28, 48.66, 30.82, 30.80, 25.67, 24.58, 23.43, 23.37. **HPLC-MS** berechnet für $\text{C}_{32}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{NiO}_3$: 568.20 $[\text{m}+\text{H}]^+$; gefunden 568.14 $[\text{m}+\text{H}]^+$. **HPLC**: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 13 min) = 9.38 min.

Synthese von (S)-2-[[[9H-Fluoren-9-yl)methoxy]carbonylamino]-2,4-dimethylpentansäure [Fmoc- α -Me-L-Leu-OH] (102)

Eine Lösung von **101** (3.73 g, 6.50 mmol) in 50 mL MeOH/HCl_{aq.} (3N) (1/1, v/v) wurde für 1 h unter Bildung einer grünen Suspension refluxiert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck vollständig entfernt und der grüne Rückstand in 100 mL Dioxan/Wasser (1/1, v/v) aufgenommen. Die Lösung wurde mit ges. Natriumcarbonatlösung auf pH 7 eingestellt und anschließend Natriumcarbonat (2.82 g, 26.1 mmol, 4 eq) sowie Fmoc-OSu (3.30 g, 10 mmol, 1.5 eq; sowie 2 × je 0.5 eq nach 3 d und 5 d) zugegeben und die Suspension bei RT für 7 d gerührt. Nach Zugabe von 100 mL Wasser wurde mit wässriger HCl (3N) der pH-Wert der Lösung auf pH 2 erhöht und anschließend mit Dichlormethan (3 × 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck vollständig entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel isoliert und als weißer Feststoff erhalten (2.34 g, 4.46 mmol, 68%).

¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ = 12.52 (s, 1H), 7.88 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.71 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 7.41 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.32 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.23 (s, 1H), 4.30 – 4.23 (m, 1H), 4.23 – 4.16 (m, J = 6.7 Hz, 1H), 1.73 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 1.68 – 1.55 (m, 1H), 1.36 (s, 1H), 0.85 (q, J = 6.5 Hz, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ = 175.64, 154.44, 143.82, 140.68, 127.56, 127.02, 125.20, 120.04, 65.19, 58.20, 46.71, 44.42, 24.10, 23.73, 23.56, 23.20. HRMS: berechnet für : 368.1856 [m+H]⁺ =; gefunden 368.1862 [m+H]⁺. HPLC: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 30 min) = 24.2 min. EE: >95%.

7.3 Peptidsynthese

7.3.1 Allgemeines

Die **Festphasensynthesen** wurden in Spritzenreaktoren (2, 5, 20 mL) bestückt mit PE-Fritten oder bei größeren Ansatzgrößen in Rosenbaum-Reaktoren durchgeführt. Die Durchmischung der Harz-Suspensionen erfolgte durch Schütteln der Spritzen bzw. Reaktoren auf einem automatischen Schüttler KS125basic (*IKA Labortechnik*). Die Vollständigkeit der Kupplungsreaktionen wurde nach Testabspaltung entsprechend **AAV 16** mittels U-HPLC Analyse überprüft. Im Falle schwieriger Sequenzen wurde zudem die Harzbeladung AAV 3 überwacht.

7.3.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV 1: Beladung von NovaSyn TGR-Harz

NovaSyn TGR Harz (0.24 mmol/g) wurde in einen Festphasenreaktor geeigneter Größe eingewogen und für 10 min in DMF gequollen. Anschließend wurde die erste Aminosäure entsprechend

AAV 7a auf den freien *N*-Terminus gekuppelt und die Harz-Beladung anhand **AAV 3** bestimmt.

AAV 2: Beladung von MBHA Rinkamid-Harz

MBHA Rinkamid-Harz (0.65 mmol/g) wurde in einen Festphasenreaktor geeigneter Größe eingewogen und für 10 min in DMF gequollen. Anschließend wurde der *N*-Terminus nach **AAV 5** entfernt und die erste Aminosäure entsprechend

AAV 7a auf den freien *N*-Terminus gekuppelt und die Harz-Beladung anhand **AAV 3** bestimmt.

AAV 3: Bestimmung der Harzbeladung anhand der Fmoc-Gruppen mittels UV-Spektroskopie

Eine geringe Menge (1-2 mg) des getrockneten Harzes wurde mit 1 mL einer Lösung aus Piperidin/DMF (1/4, v/v) versetzt und 15 min bei RT geschüttelt. Das Harz wurde abzentrifugiert, die Lösung 1:10 in Piperidin/DMF verdünnt und die Absorption des Fluorenyl-Addukts bei 301 nm bestimmt. Die Harzbeladung wurde mithilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnet ($\epsilon = 7800 \text{ L M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

AAV 4: Automatische Synthese von Wildtyp-Sequenzen am CEM Liberty Syntheseroboter

Die Fmoc-Gruppe wurde mit einer Lösung aus Piperidin/DMF (1/4, v/v) für 1 min bei 30 °C (Intensität = 40 W) und 5 min bei 70 °C (Intensität = 40 W) entfernt. Zur Unterdrückung von Aspartamid-Bildung wurde der Entschützungslösung gegebenenfalls zudem HOBt (0.5 M) zugesetzt. Die Kupplung der Aminosäuren erfolgte in Form von Doppelkupplungen in DMF unter Verwendung von Aminosäure (4 eq., 0.2 M in DMF), HCTU (3.9 eq., 0.2 M in DMF) und DIEA (8 eq., 0.2 M in NMP) für 10 min bei 80 °C (Intensität = 20 W). Im Falle von His- oder Cys-Resten wurden die Reagenzien für 15 min bei 60 °C (Intensität = 20 W) zur Reaktion gebracht.

AAV 5: Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe an der Festphase

Das mit DMF gewaschene Harz wurde mit einer Lösung aus Piperidin in DMF (1/4, v/v) versetzt und für 5 min geschüttelt. Nach einmaligem Waschen des Harzes mit DMF wurde der Vorgang für 5 min wiederholt. Anschließend wurde das Harz mit DMF (3× 1 min), DCM (3×1 min) und DMF (3 × 1 min) gewaschen.

AAV 6: Festphasensynthese des linearen Peptids mit der COMU/Oxyima Methode

Nach dem Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe mittels **AAV 5** wurde zum DMF gewaschenen Harz eine Lösung aus 4.0 eq Aminosäure, 3.9 eq COMU, 3.9 eq Oxyima und 8.0 eq DIEA (bezogen auf den freien *N*-Terminus) in DMF (0.5 M) gegeben. Das Reaktionsgefäß wurde für 30 min geschüttelt und mit DMF (5 × 1 min) gewaschen. Im Falle unvollständigen Umsatzes (UHPLC-Kontrolle) wurde die Kupplung wiederholt.

AAV 7: Festphasensynthese des linearen Peptids mit der HCTU bzw. HATU/HOAt Methode

Nach dem Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe mittels **AAV 5** wurde zum DMF gewaschenen Harz eine Lösung aus

a) 4.0 eq Aminosäure, 3.9 eq HCTU und 8.0 eq DIEA

b) 4.0 eq Aminosäure, 3.9 eq HATU, 3.9 eq HOAt und 8.0 eq DIEA

(bezogen auf den freien *N*-Terminus) in DMF (0.5 M) gegeben. Das Reaktionsgefäß wurde für 60 min geschüttelt und mit DMF (5 × 1 min) gewaschen. Im Falle unvollständigen Umsatzes (UHPLC-Kontrolle) wurde die Kupplung wiederholt.

AAV 8: Ringschlussmetathese Reaktion an der Festphase

Das immobilisierte Peptid wurde mit DCM (3 ×) gewaschen und in DCE gequollen (10 min). Eine Lösung aus **a)** Grubbs I oder **b)** Hoveyda-Grubbs II Katalysator in DCE (2 mg/mL, 1 mL/g Harz) wurde zum Harz gegeben und bei RT für 2 h zur Reaktion gebracht, wobei das entstehende Ethen durch Durchblubbern von Argon ausgetrieben wurde. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurde das Harz mit DCM (3 × 1 min), DMF (3 × 1 min), Methanol (3 × 1 min) und DCM (3 × 1 min) gewaschen.

AAV 9: Abspaltung von Alloc-/Allyl-Schutzgruppen an der festen Phase

Das in DMF gewaschene Harz wurde dreimal eine Minute mit trockenem THF gewaschen. Anschließend wurde pro Alloc-/Allyl-Schutzgruppe eine Lösung aus 12 eq Phenylsilan und 0.12 eq Pd(PPh₃)₄ in trockenem THF (5 mL/g Harz) gegeben und für 30 min geschüttelt. Anschließend wurde das Harz mit THF (3 × 1 min), DCM (3 × 1 min) und DMF (3 × 1 min) gewaschen und der Waschvorgang ein weiteres Mal wiederholt.

AAV 10: Abspaltung der Mmt- und Mtt-Schutzgruppe an der Festphase

Das in DCM gequollene Harz wurde mit einer Lösung aus DCM/TFA/TIPS (97/1/2, v/v/v) versetzt, für 15 min geschüttelt und anschließend mit DCM (1 × 1 min) gewaschen. Die Prozedur wurde zweimal wiederholt (bzw. bis das Ausbleiben des gelben Monomethoxytritylium- bzw. Ions die vollständige Entfernung der Schutzgruppe anzeigte). Anschließend wurde das Harz mit DCM (3 × 1 min) gewaschen.

AAV 11: Disulfidbildung an der Festphase

Das immobilisierte und an den Cys-Resten partiell entschützte Peptid wurde in DCM gequollen und in einer Lösung von NCS (1.1 eq) in DCM (0.2 M) für 15 min geschüttelt. Anschließend wurde das Harz mit DCM (3 × 1 min), DMF (3 × 1 min) und DCM (3 × 1 min) gewaschen.

AAV 12: Zyklisierung an der festen Phase

Das immobilisierte und partiell entschützte Peptid wurde mit einer Lösung aus PyBOP (5 eq bezogen auf die freie Aminofunktion, 0.5 M) und DIEA (10 eq) in DMF versetzt und für 2 h geschüttelt. Anschließend wurde das Harz mit DMF (3 × 1 min), DCM (3 × 1 min) und DMF (3 × 1 min) gewaschen.

AAV 13: Markierung des N-Terminus mit FITC an der Festphase

Nach dem Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe mittels **AAV 5** wurde zum DMF gewaschenen Harz eine Lösung aus FITC (4.0 eq) und DIEA (8.0 eq , jeweils bezogen auf den freien *N*-Terminus) in DMF (0.5 M) gegeben. Das Reaktionsgefäß unter Lichtausschluss für 10 h geschüttelt, mit DMF (5×) und DCM (5×) gewaschen und im Vakuum getrocknet.

AAV 14: Acetylierung des N-Terminus an der Festphase

Nach dem Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe mittels **AAV 5** wurde zum DMF gewaschenen Harz eine Lösung aus Ac₂O/DIEA/DMF (1/1/8, v/v/v) gegeben und für 10 min geschüttelt. Das Harz wurde DMF gewaschen und die Acetylierung wiederholt. Anschließend wurde das Harz mit DMF (3 × 1 min), DCM (3 × 1 min) und DMF (3 × 1 min) gewaschen.

AAV 15: Markierung des N-Terminus mit Biotin an der Festphase

Nach dem Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe mittels **AAV 5** wurde zum DMF gewaschenen Harz eine Lösung aus Biotin (5.0 eq), HCTU (5.0 eq) und DIEA (10.0 eq, jeweils bezogen auf den freien *N*-Terminus) in DMF (0.5 M) gegeben. Das Reaktionsgefäß wurde unter Lichtausschluss für 2 h geschüttelt und mit DMF (5 × 1 min) und DCM (5 × 1 min) gewaschen.

AAV 16: Testabspaltung eines Peptids vom Harz

Zur Überprüfung des Synthesefortschritts des immobilisierten Peptids wurden ca. 1 mg des beladenen Harzes mit 100 µL einer Lösung aus TFA/TES/H₂O (95/2.5/2.5, v/v/v) in einem 1.5 mL Eppendorf Reaktionsgefäß behandelt und für 30 min geschüttelt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Argonstrom entfernt und der Rückstand unter Vortexen mit kaltem Diethylether gewaschen. Das Peptid wurde in der Tischzentrifuge präzipitiert (5 min, 16.7 rpm), und nach Entfernen des Diethylethers in einem Gemisch aus MeCN/H₂O (1/1, v/v) gelöst und mittels U-HPLC untersucht.

AAV 17: Abspaltung vom Harz

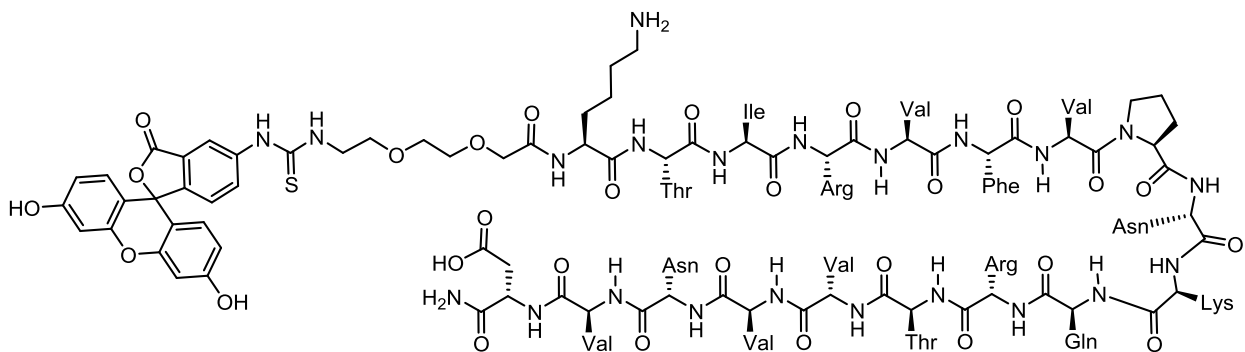
Das DCM gewaschene Harz wurde einer Abspalllösung aus TFA/TES/H₂O (95/2.5/2.5, v/v/v) bzw. im Fall oxidationsempfindlicher Peptide mit TFA/TES/H₂O/DODT (94/2.5/2.5/1, v/v/v/v) versetzt und für 3 × 1h geschüttelt. Im Anschluss wurde das Harz mit Abspalllösung gewaschen (3×). Nach

dem Einengen der vereinigten Lösungen im Argonstrom wurde das Peptid in kaltem Diethylether präzipitiert und abzentrifugiert, mit kaltem Diethylether gewaschen, getrocknet und mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

7.3.3 Übersicht synthetisierter Peptide

Peptide aus Abschnitt 5.2.1

Peptid 38



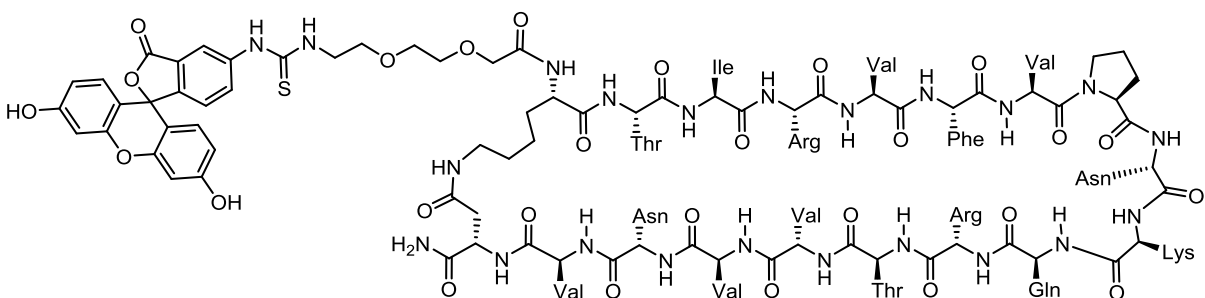
Die Synthese wurde manuell im 10 μmol Maßstab an NovaSyn TGR-Harz (0.24 mmol/g) durchgeführt. Dazu wurde das Harz in einen 2 mL Spritzenreaktor eingewogen, nach **AAV 1** Asp(OAll) beladen und die lineare Sequenz anhand von **AAV 5** und **AAV 6** aufgebaut. Anschließend wurde das Peptid *N*-terminal entsprechend **AAV 13** mit FITC markiert, nach **AAV 17** vom Harz abgespalten und mittels präparativer HPLC-MS aufgereinigt.

Ausbeute: 0.17 μmol (1.7 %); **Reinheit:** 88%.

HPLC: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 30 min) = 17.26 min.

HRMS: berechnet für: 532.8788 $[m+5H]^{5+}$; gefunden 532.8804 $[m+5H]^{5+}$.

Peptid 39



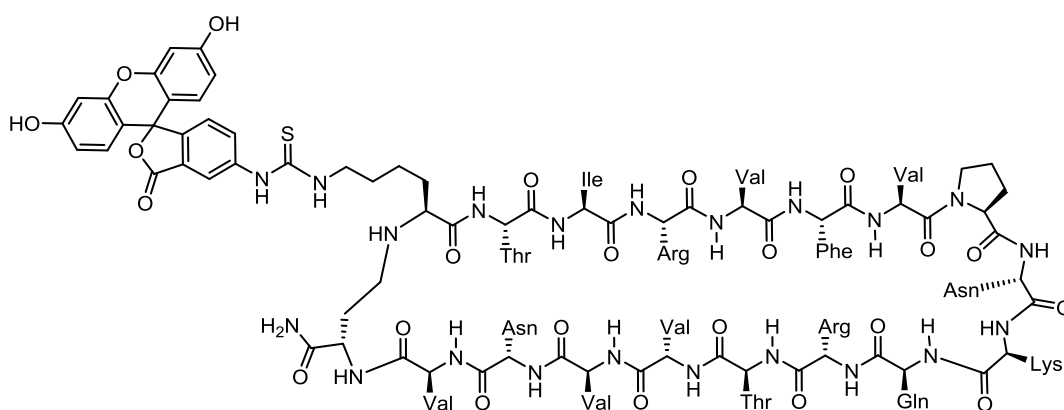
Die Synthese wurde manuell im 10 μmol Maßstab an NovaSyn TGR-Harz (0.24 mmol/g) durchgeführt. Dazu wurde das Harz in einen 2 mL Spritzenreaktor eingewogen, nach **AAV 1** mit Asp(OAll) beladen und die lineare Sequenz anhand von **AAV 5** und **AAV 6** aufgebaut. Anschließend wurde die Seitenketten-Schutzgruppe des C-terminalen Asp(OAll) und des N-terminalen Lys(Mtt) entsprechend **AAV 9** und **AAV 10** entfernt und die Seitenketten-zu-Seitenketten-Zyklisierung nach **AAV 12** durchgeführt. Im Anschluss wurde die N-terminale α -Aminofunktion nach **AAV 5** entschützt und entsprechend **AAV 13** mit FITC markiert. Nach Abspaltung vom Harz (**AAV 17**) wurde das Peptid mittels präparativer HPLC-MS aufgereinigt.

Ausbeute: 0.33 μmol (3.3 %); **Reinheit:** >95%.

HPLC: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 30 min) = 18.78 min.

HRMS: berechnet für: 661.3441 $[\text{m}+4\text{H}]^{4+}$; gefunden 661.3450 $[\text{m}+4\text{H}]^{4+}$.

Peptid 40

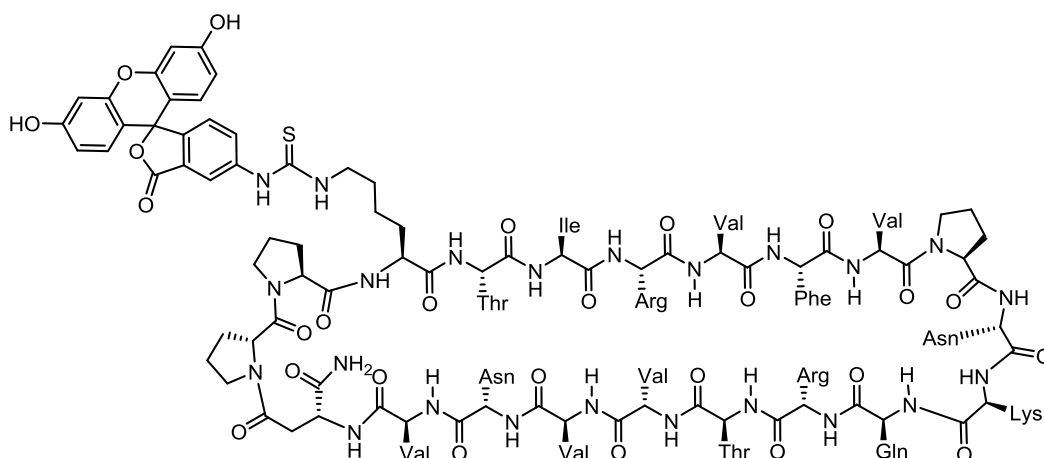


Die Synthese wurde manuell im 10 μmol Maßstab an NovaSyn TGR-Harz (0.24 mmol/g) durchgeführt. Dazu wurde das Harz in einen 2 mL Spritzenreaktor eingewogen, nach **AAV 1** mit Asp(OAll) beladen und die lineare Sequenz anhand von **AAV 5** und **AAV 6** aufgebaut. Nach Entfernen der Seitenketten-Schutzgruppe des C-terminalen Asp(OAll) (**AAV 9**) und α -Amino-Schutzgruppe des N-terminalen Lysins (**AAV 5**) wurde die Makrozyklisierung entsprechend **AAV 12** durchgeführt. Anschließend wurde die Mtt-Schutzgruppe des terminalen Lysins entfernt (**AAV 10**) und die Seitenkette entsprechend **AAV 13** mit FITC markiert. Nach Abspaltung vom Harz (**AAV 17**) wurde das Peptid mittels präparativer HPLC-MS aufgereinigt.

Ausbeute: 0.18 μmol (1.8 %); **Reinheit:** 88%.

HPLC: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 30 min) = 19.07 min.

HRMS: berechnet für: 625.0756 $[\text{m}+4\text{H}]^{4+}$; gefunden 625.0756 $[\text{m}+4\text{H}]^{4+}$.

Peptid 41

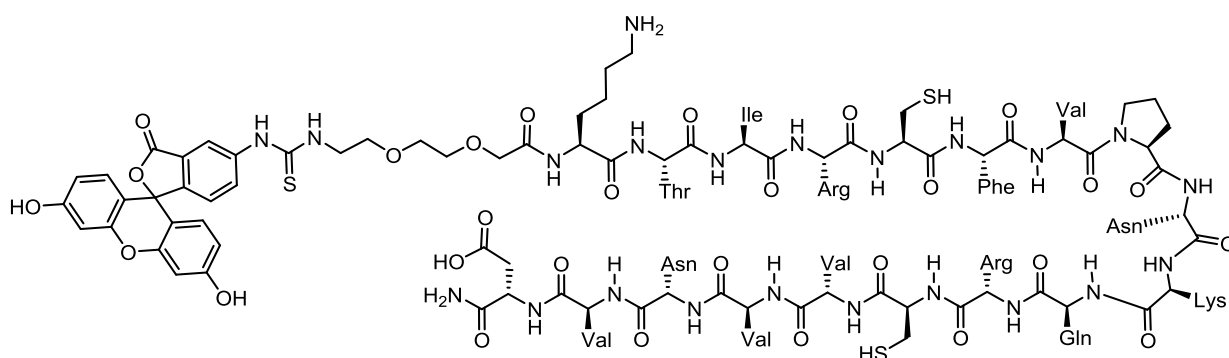
Die Synthese wurde manuell im 10 μmol Maßstab an NovaSyn TGR-Harz (0.24 mmol/g) durchgeführt. Dazu wurde das Harz in einen 2 mL Spritzenreaktor eingewogen, nach **AAV 1** mit Asp(OAll) beladen und die lineare Sequenz anhand von **AAV 5** und **AAV 6** aufgebaut. Nach Entfernen der Seitenketten-Schutzgruppe des C-terminalen Asp(OAll) (**AAV 9**) und α -Amino-Schutzgruppe des N-terminalen D-Prolins (**AAV 5**) wurde die Makrozyklisierung entsprechend **AAV 12** durchgeführt. Anschließend wurde die Mtt-Schutzgruppe des N-terminalen Lysins entfernt (**AAV 10**) und die Seitenkette entsprechend **AAV 13** mit FITC markiert. Nach Abspaltung vom Harz (**AAV 17**) wurde das Peptid mittels präparativer HPLC-MS aufgereinigt.

Ausbeute: 42 nmol (0.4 %); **Reinheit:** >95%.

HPLC: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 30 min) = 19.88 min.

HRMS: berechnet für: $[\text{m}+4\text{H}]^{4+}$ 673.6020 =; gefunden 673.6035 $[\text{m}+4\text{H}]^{4+}$.

Peptid 42



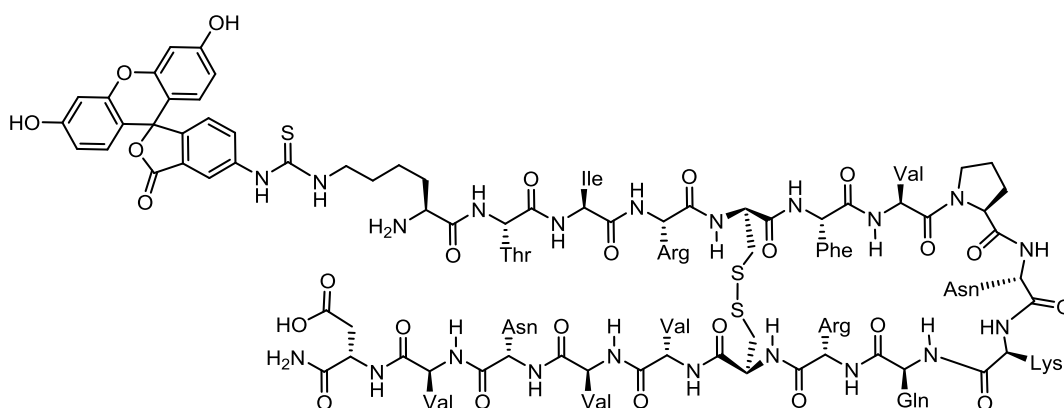
Die Synthese wurde manuell im 10 μmol Maßstab an NovaSyn TGR-Harz (0.24 mmol/g) durchgeführt. Dazu wurde das Harz in einen 2 mL Spritzenreaktor eingewogen, nach **AAV 1** mit Asp(OAll) beladen und die lineare Sequenz anhand von **AAV 5** und **AAV 6** aufgebaut. Anschließend wurde das Peptid *N*-terminal entsprechend **AAV 13** mit FITC markiert, nach **AAV 17** vom Harz abgespalten und mittels präparativer HPLC-MS aufgereinigt.

Ausbeute: 0.61 μmol (6.1 %); **Reinheit:** >95%.

HPLC: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 30 min) = 18.91 min.

HRMS: berechnet für: 889.4280 [$m+3H$]³⁺; gefunden 889.42739 [$m+3H$]³⁺.

Peptid 43



Die Synthese wurde manuell im 10 μmol Maßstab an NovaSyn TGR-Harz (0.24 mmol/g) durchgeführt. Dazu wurde das Harz in einen 2 mL Spritzenreaktor eingewogen, nach **AAV 1** mit Asp(OAll) beladen und die lineare Sequenz anhand von **AAV 5** und **AAV 6** aufgebaut. Anschließend wurden Mmt-Schutzgruppen der beiden Cysteinseitenketten und die Mtt-Schutzgruppe des *N*-terminalen Lysins entsprechend **AAV 10** entfernt und die Disulfidbrücke nach **AAV 11** geschlossen. Dann wurde das Peptid an der Seitenkette des *N*-terminalen Lys entsprechend **AAV 13** mit FITC

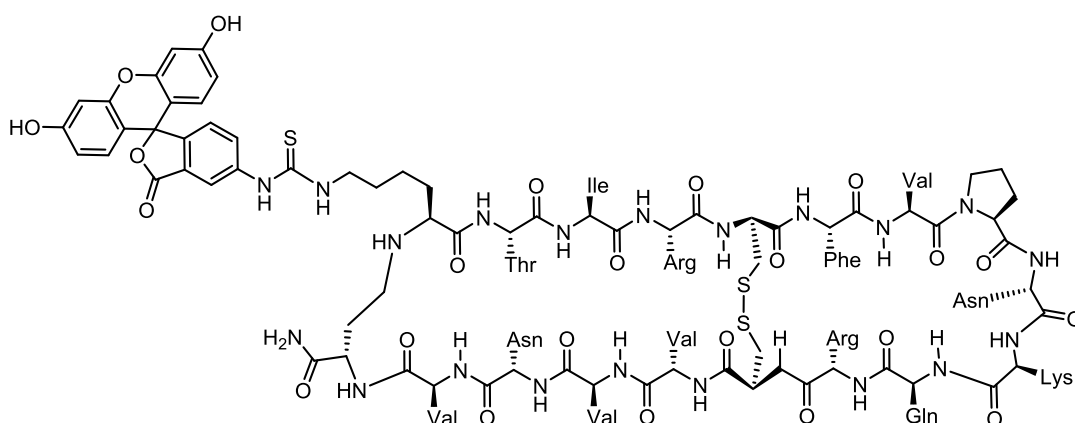
markiert. Nach Entfernung der Allyl-Schutzgruppe des C-terminalen Asp und der Fmoc-Schutzgruppe des N-terminalen Lys entsprechend **AAV 9** und **AAV 5** wurde das Peptid nach **AAV 17** vom Harz abgespalten und mittels präparativer HPLC-MS aufgereinigt.

Ausbeute: 23 nmol (0.02 %); **Reinheit:** >95%.

HPLC: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 30 min) = 18.91 min.

HRMS: berechnet für: 630.5499 [m+4H]⁴⁺; gefunden 630.5514 [m+4H]⁴⁺.

Peptid 44



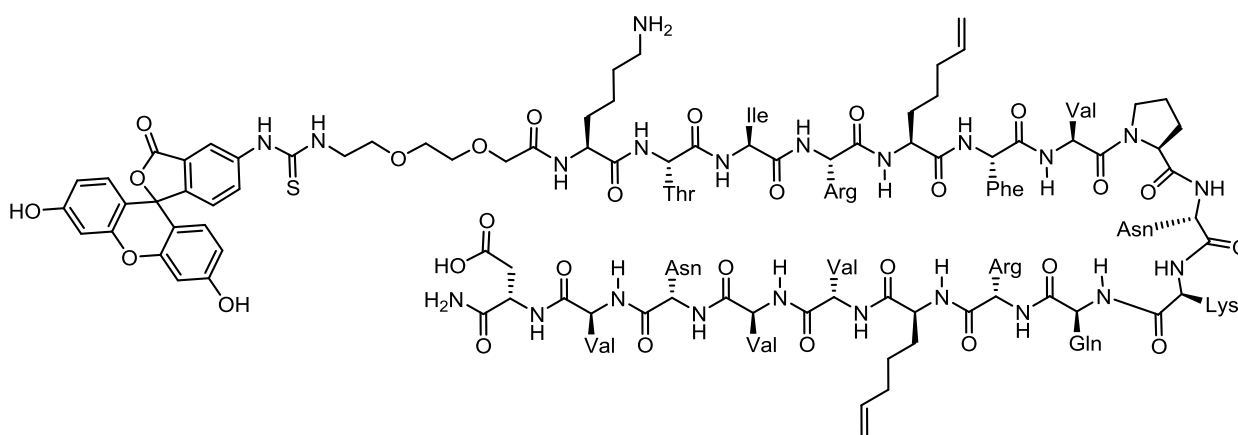
Die Synthese wurde manuell im 10 µmol Maßstab an NovaSyn TGR-Harz (0.24 mmol/g) durchgeführt. Dazu wurde das Harz in einen 2 mL Spritzenreaktor eingewogen, nach **AAV 1** mit Asp(OAll) beladen und die lineare Sequenz anhand von **AAV 5** und **AAV 6** aufgebaut. Nach Entfernen der Seitenketten-Schutzgruppe des C-terminalen Asp(OAll) (**AAV 9**) und der α-Amino-Schutzgruppe des N-terminalen Lysins (**AAV 5**) wurde die Makrozyklisierung entsprechend **AAV 12** durchgeführt. Anschließend wurden Mmt-Schutzgruppen der beiden Cysteinseitenketten und die Mtt-Schutzgruppe des N-terminalen Lysins entsprechend **AAV 10** entfernt und die Disulfidbrücke nach **AAV 11** geschlossen. Dann wurde das Peptid an der Seitenkette des N-terminalen Lys entsprechend **AAV 13** mit FITC markiert. Nach Abspaltung vom Harz (**AAV 17**) wurde das Peptid mittels präparativer HPLC-MS aufgereinigt.

Ausbeute: 25 nmol (0.03 %); **Reinheit:** >95%.

HPLC: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 30 min) = 19.97 min.

HRMS: berechnet für: 882.7520 [m+3H]³⁺; gefunden 882.7520 [m+3H]³⁺.

Peptid 45



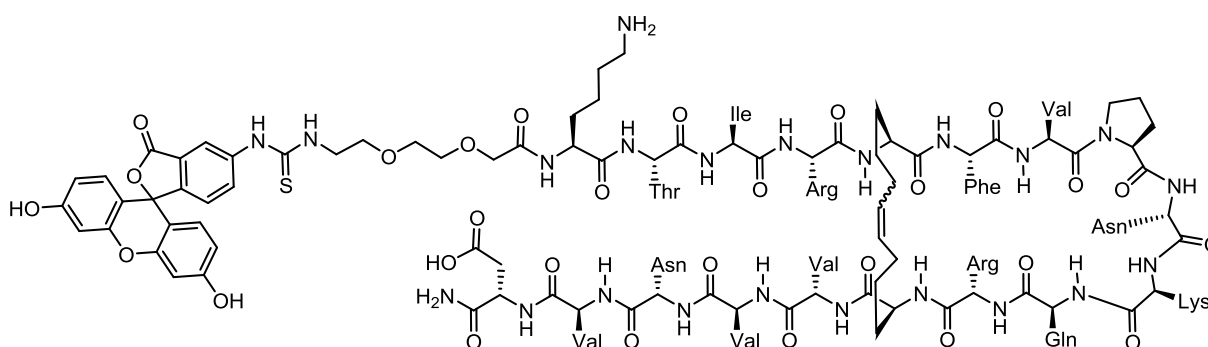
Die Synthese wurde manuell im 10 μmol Maßstab an NovaSyn TGR-Harz (0.24 mmol/g) durchgeführt. Dazu wurde das Harz in einen 2 mL Spritzenreaktor eingewogen, nach **AAV 1** mit Asp(OAll) beladen und die lineare Sequenz anhand von **AAV 5** und **AAV 6** aufgebaut. Anschließend wurde das Peptid *N*-terminal entsprechend **AAV 13** mit FITC markiert, nach **AAV 17** vom Harz abgespalten und mittels präparativer HPLC-MS aufgereinigt.

Ausbeute: 0.88 μmol (8.8 %); **Reinheit:** 92%.

HPLC: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 30 min) = 17.32 min.

HRMS: berechnet für: 904.1440 $[m+3H]^{3+}$; gefunden 904.1464 $[m+3H]^{3+}$.

Peptid 46A/B



Die Synthese wurde manuell im 10 μmol Maßstab an NovaSyn TGR-Harz (0.24 mmol/g) durchgeführt. Dazu wurde das Harz in einen 2 mL Spritzenreaktor eingewogen, nach **AAV 1** mit Asp(OAll) beladen und die lineare Sequenz anhand von **AAV 5** und **AAV 6** aufgebaut. Die Ringschlussmetathese wurde entsprechend

AAV 8 durchgeführt. Anschließend wurde das Peptid *N*-terminal entsprechend **AAV 13** mit FITC markiert, nach **AAV 17** vom Harz abgespalten und die beiden *cis/trans*-Isomere mittels präparativer HPLC-MS aufgereinigt.

Isomer A

Ausbeute: 4 nmol (0.04 %); **Reinheit:** >95%.

HPLC: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 30 min) = 22.8 min.

HRMS: berechnet für: 671.3519 $[\text{m}+4\text{H}]^{4+}$; gefunden 671.3520 $[\text{m}+4\text{H}]^{4+}$.

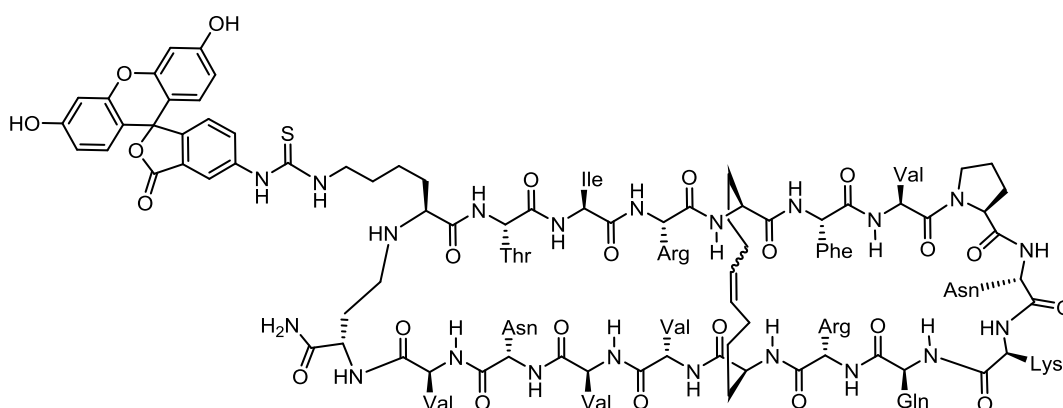
Isomer B

Ausbeute: 9 nmol (0.09 %); **Reinheit:** >95%.

HPLC: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 30 min) = 23.4 min.

HRMS: berechnet für: 671.3519 $[\text{m}+4\text{H}]^{4+}$; gefunden 671.3522 $[\text{m}+4\text{H}]^{4+}$.

Peptid 47A/B



Die Synthese wurde manuell im 10 μmol Maßstab an NovaSyn TGR-Harz (0.24 mmol/g) durchgeführt. Dazu wurde das Harz in einen 2 mL Spritzenreaktor eingewogen, nach **AAV 1** mit Asp(OAll) beladen und die lineare Sequenz anhand von **AAV 5** und **AAV 6** aufgebaut. Nach Entfernen der Seitenketten-Schutzgruppe des C-terminalen Asp(OAll) (**AAV 9**) und α -Amino-Schutzgruppe des N-terminalen Lysins (**AAV 5**) wurde die Makrozyklisierung entsprechend **AAV 12** durchgeführt. Dann wurde die Ringschlussmetathese entsprechend

AAV 8 durchgeführt. Anschließend wurde die Mtt-Schutzgruppe des N-terminalen Lysins entsprechend **AAV 10** entfernt und die Seitenkette entsprechend **AAV 13** mit FITC markiert. Nach Abspaltung vom Harz (**AAV 17**) wurden die beiden *cis/trans*-Isomere mittels präparativer HPLC-MS aufgereinigt.

Isomer A

Ausbeute: 4 nmol (0.04 %); **Reinheit:** >95%.

HPLC: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 30 min) = 18.85 min.

HRMS: berechnet für: 888.7967 $[\text{m}+3\text{H}]^{3+}$; gefunden 888.7987 $[\text{m}+3\text{H}]^{3+}$.

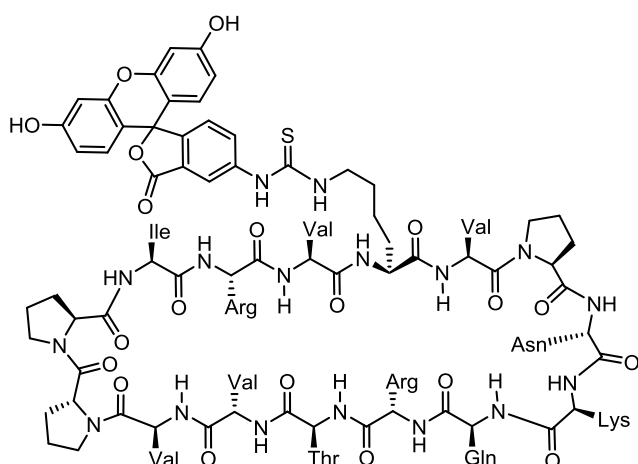
Isomer B

Ausbeute: 1 nmol (0.01 %); **Reinheit:** >95%.

HPLC: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 30 min) = 19.76 min.

HRMS: berechnet für: 888.7967 $[\text{m}+3\text{H}]^{3+}$; gefunden 888.7956 $[\text{m}+3\text{H}]^{3+}$.

Peptid 48

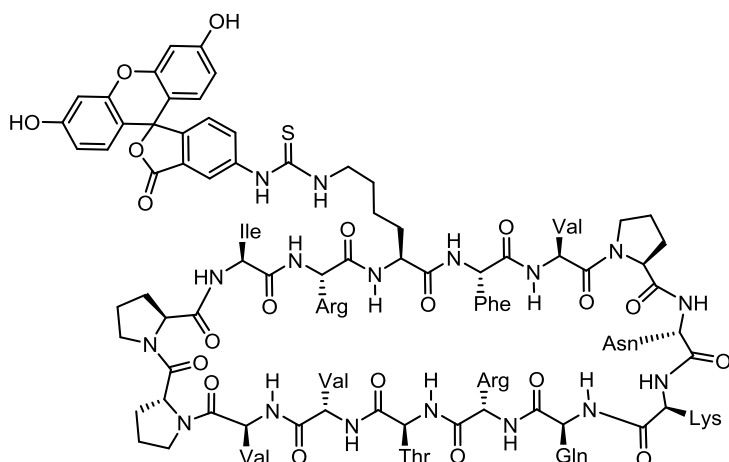


Die Synthese wurde manuell im 10 μmol Maßstab an NovaSyn TGR-Harz (0.24 mmol/g) durchgeführt. Dazu wurde das Harz in einen 2 mL Spritzenreaktor eingewogen, nach **AAV 1** über die Seitenkette mit Fmoc-Asp(OH)-OAll beladen und die lineare Sequenz anhand von **AAV 5** und **AAV 6** aufgebaut. Anschließend wurde die Allylschutzgruppe am C-terminalen Asp und die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe entsprechend **AAV 9** und **AAV 5** entfernt und die Rückgratzyklisierung nach **AAV 12** durchgeführt. Nach Entfernung der orthogonalen Lys(Mtt)-Schutzgruppe (**AAV 10**) wurde die Lysin-Seitenkette entsprechend **AAV 13** mit FITC markiert. Nach Abspaltung vom Harz (**AAV 17**) wurde das Peptid mittels präparativer HPLC-MS aufgereinigt.

Ausbeute: 0.15 μmol (1.5 %); **Reinheit:** >95%.

HPLC: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 30 min) = 15.73 min.

HRMS: berechnet für: 754.4015 $[\text{m}+3\text{H}]^{3+}$; gefunden 754.4019 $[\text{m}+3\text{H}]^{3+}$.

Peptid 49

Die Synthese wurde manuell im 10 μmol Maßstab an NovaSyn TGR-Harz (0.24 mmol/g) durchgeführt. Dazu wurde das Harz in einen 2 mL Spritzenreaktor eingewogen, nach **AAV 1** über die Seitenkette mit Fmoc-Asp(OH)-OAll beladen und die lineare Sequenz anhand von **AAV 5** und **AAV 6** aufgebaut. Anschließend wurde die Allylschutzgruppe am C-terminalen Asp und die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe entsprechend **AAV 9** und **AAV 5** entfernt und die Rückgratzyklisierung nach **AAV 12** durchgeführt. Nach Entfernung der orthogonalen Lys(Mtt)-Schutzgruppe (**AAV 10**) wurde die Lysin-Seitenkette entsprechend **AAV 13** mit FITC markiert. Nach Abspaltung vom Harz (**AAV 17**) wurde das Peptid mittels präparativer HPLC-MS aufgereinigt.

Ausbeute: 0.17 μmol (1.7 %); **Reinheit:** >95%.

HPLC: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 30 min) = 19.74 min.

HRMS: berechnet für: 770.4015 $[\text{m}+3\text{H}]^{3+}$; gefunden 770.4026 $[\text{m}+3\text{H}]^{3+}$.

Peptide aus Abschnitt 5.2.2

Tabelle 4 Übersicht über die dargestellten Peptide aus Abschnitt 5.2.2

Eintrag	Terminale mod. ^[a]	Sequenz ^[b]	Reinheit [%] ^[c]	HPLC (tr, [min]) ^[d]	Ausbeute [%] ^[e]	MS (berechnet)	MS (gefunden)
50	F	FFGIYLTNLIKTEEGN	>95	15.21	3.6*	798.38	798.67 [m+3H] ³⁺ [f]
51	F	FEGYRLELLKAEEN	>95	12.50	3.4*	810.36	810.77 [m+3H] ³⁺ [f]
52	F	YLGMYLTDLVFIEEGT	>95	9.32	0.4*	1199.0207	1199.0022 [m+2H] ²⁺
53	F	FFGIYLTNS ₅ LKT ₅ EGN	>95	21.16	8.0*	1200.5664	1200.5687 [m+2H] ²⁺
54	F	FFGIS ₅ LTNS ₅ LKTEEGN	>95	20.26	10.0*	1183.5561	1183.5582 [m+2H] ²⁺
55	F	FFGIY ₅ TNI ₅ S ₅ KTEEGN	>95	19.32	10.1*	1208.0418	1208.0415 [m+2H] ²⁺
56	F	FFGIY ₅ R ₅ TNI ₅ S ₅ LKTEEGN	94	19.12	15.1*	1208.5457	1208.5476 [m+2H] ²⁺
57	F	FEGIS ₅ RLE ₅ LKAEEN	>95	13.13	2.4*	812.72	813.39 [m+3H] ³⁺ [f]
58	F	FEGYRLE ₅ LKA ₅ S ₅ EAN	>95	14.51	2.4*	803.70	804.46 [m+3H] ³⁺ [f]
59	F	FEGY ₅ LE ₅ LE ₅ LKA ₅ EEN	>95	13.46	2.0*	801.38	802.08 [m+3H] ³⁺ [f]
60	Z	XFEGIYRLELLKAEENK(FITC)	83	12.17	1.3*	835.72	836.49 [m+3H] ³⁺ [f]

[a] F = N-terminal Fluorescein-O2Oc; Z = Fluorescein an der Seitenkette des C-terminalen Lysins

[b] Durch Ringschlussmetathese verbrückte Reste sind durch Unterstrich gekennzeichnet

[c] Anhand der UV-Absorption bei 210 nm bestimmt

[d] Retentionszeit der Synthetisierten Peptide (10-90% MeCN (0.1% TFA), 30 min)

[e] Die Ausbeute der Peptide wurde auf die vom Hersteller des Harzes angegebene Beladungsdichte bezogen und die Peptidmenge anhand der Absorption bei 496 nm (Fluorescein-markierte Peptide; *), ihrer Absorption bei 280 nm (') oder gravimetrisch bestimmt (#)

[f] ESI-MS

Peptide aus Abschnitt 5.2.3.

Tabelle 5. Übersicht über die dargestellten Peptide aus Abschnitt 5.2.3.

Eintrag	N-Term mod. ^[a]	Sequenz ^[b]	Reinheit [%] ^[c]	HPLC (t _R , [min]) ^[d]	Ausbeute [%] ^[e]	HRMS (berechnet)	HRMS (gefunden)
61	F	QQLQRRHIGN	>95	10.5	5.1*	478.4824	478.4811[m+H] ⁺
62a	F	QQLQR _S RRHIS _S ND	>95	11.64	10.5*	697.6670	697.6662[m+3H] ³⁺
62b	Ac		>95	9.94	38.8"	1598.8873	1598.8898[m+H] ⁺
63a	F	QQLQ _S KRRHS _S GND	>95	11.34	10.5*	501.9809	501.9808[m+4H] ⁴⁺
63b	Ac		94	9.11	26.7"	1514.8186	1514.8218[m+H] ⁺
64a	F	QQL _S RRKR _S IGND	>95	10.41	4.0*	671.0000	671.0015[m+3H] ³⁺
64b	Ac		93	7.82	36.9"	1518.8863	1518.8861[m+H] ⁺
65a	F	QQL _S QRRK _S HIGND	>95	10.33	8.3*	1003.9625	1003.9653[m+2H] ²⁺
65b	Ac		>95	7.09	34.3"	1514.8186	1514.8218[m+H] ⁺

[a] F = Fluorescein-O2Oc-; Ac = Acetyliert;

[b] Durch Ringschlussmetathese verbrückte Reste sind durch Unterstrich gekennzeichnet

[c] Anhand der UV-Absorption bei 210 nm bestimmt

[d] Retentionszeit der Synthetisierten Peptide (10-90% MeCN (0.1% TFA), 30 min)

[e] Die Ausbeute der Peptide wurde auf die vom Hersteller des Harzes angegebene Beladungsdichte bezogen und die Peptidmenge anhand der Absorption bei 496 nm (Fluorescein-markierte Peptide; *) ihrer Absorption bei 280 nm (") oder gravimetrisch bestimmt (#)

Peptide aus Abschnitt 5.3.2.

Tabelle 6. Übersicht über die dargestellten Peptide aus Abschnitt 5.3.2

Eintrag	N-Term. mod. ^[a]	Sequenz	Reinheit [%] ^[b]	HPLC (t _r , [min]) ^[c]	Ausbeute [%] ^[d]	MS (berechnet)	MS (gefunden)
66a	F		83	16.58	4.0*	2600.1206	1301.06883 [m+2H] ²⁺
66b	Ac	DDEKEQFLYHLLSFNAV	>95	13.95	16.8 [#]	2108.0215	1055.01900 [m+2H] ²⁺
66c	B		94 ^{ES}	15.84	11.8 [#]	2594.2727	1298.1443 [m+2H] ²⁺
67a	F	LSLEMEKQLETINNLIMS	>95	19.01	2.6*	2638.2005	1320.10957 [m+2H] ²⁺
68a	F		91	14.60	16.5*	2003.0087	1002.50872 [m+2H] ²⁺
68b	Ac	LLHKHNGLNKLA	>95	12.31	11.5 [#]	1510.9096	756.46241 [m+2H] ²⁺
68c	B		>95	12.85	23*	1997.1608	999.58684 [m+2H] ²⁺
69a	F	TVKKLVHHNKGLTTIHKERV	>95	12.51	5.9 [#]	2999.5440	1000.85100 [m+3H] ³⁺
70a	F	VQRDFVKLSQTLQV	>95	15.43	2.3*	2193.0565	732.02826 [m+3H] ³⁺
71a	F	FEQILQERNELKAKVLLKEE	95	15.11	2.2*	3136.5580	1046.52712 [m+3H] ³⁺
72a	F	LMEQIKLLKSEIRRLER	>95	15.28	2.2*	2687.3928	896.80503 [m+3H] ³⁺
73a	F	LGQEELEELTASLFEEAHKMOV	90	20.55	2.0*	2806.2506	1404.13342 [m+2H] ²⁺
73b	Ac		>95	18.62	4.1 [#]	2314.1515	1158.08866 [m+2H] ²⁺
74a	F	GELPQCFCRMCVAF	95	19.50	2.2*	2135.8072	1068.90816 [m+2H] ²⁺
74b	Ac		>95	17.96	7.6 [#]	1643.7081	822.35697 [m+2H] ²⁺
75a	F	LEDYIDNLLVRVME	>95	17.00	1.7*	1128.00 ^[f]	1128.14 ^[f] [m+2H] ²⁺
76a	F	NFRLQDYIDRIIVAIM E	>95	15.98	3.3*	1102.07 ^[f]	1102.28 ^[f] [m+2H] ²⁺

[a] F = Fluorescein-O2OC-; Ac = Acetyliert; B = Biotin-TTDS-

[b] Durch Ringschlussmetathese verbrückte Reste sind durch Unterstrich gekennzeichnet

[c] Anhand der UV-Absorption bei 210 nm bestimmt

[d] Retentionszeit der Synthetisierten Peptide (5-65% MeCN (0.1% TFA), 30 min)

[e] Die Ausbeute der Peptide wurde auf die vom Hersteller des Harzes angegebene Beladungsdichte bezogen und die Peptidmenge anhand der Absorption bei 496 nm (Fluorescein-markierte Peptide; *), ihrer Absorption bei 280 nm ([#]) oder gravimetrisch bestimmt ([#])

[f] ESI-MS

Peptide aus Abschnitt 5.3.4.

Tabelle 6. Übersicht über die dargestellten Peptide aus Abschnitt 5.3.4

Eintrag	N-Term mod. ^[a]	Sequenz ^[b]	Reinheit [%] ^[c]	HPLC (t _R [min]) ^[d]	Ausbeute [%] ^[e]	HRMS (berechnet)	HRMS (gefunden)
77a	F	DDEKEQFLYH <u>S₅</u> LSF <u>S₅</u> AV	>95	19.06	15.2	2623.1617	1312.58838 [m+2H] ²⁺
77b	Ac		>95	17.56	11.7 [#]	2131.0626	1066.53951 [m+2H] ²⁺
78a	F	DDEKEQ <u>S₅</u> LYH <u>S₅</u> LSFN <u>A</u> V	>95	16.66	29.1	2590.1362	1296.07814 [m+2H] ²⁺
78b	Ac		>95	15.26	8.5 [#]	2098.0371	1050.02674 [m+2H] ²⁺
79a	F	DDE <u>S₅</u> EQF <u>S₅</u> YHLLSFN <u>A</u> V	>95	20.61	5.6	2609.1097	1305.56853 [m+2H] ²⁺
79b	Ac		>95	19.46	11.0 [#]	2117.0106	1068.02672 [m+2H] ²⁺
79c	B		92	19.12	13.0 [#]	2603.2618	1059.51703 [m+2H] ²⁺
80a	F	KEQFLYH <u>S₅</u> LSF <u>S₅</u> AV	>95	18.78	4.8 [*]	2264.0653	1133.04064 [m+2H] ²⁺
80b	Ac		>95	18.12	18.0 [#]	1771.9661	886.99016 [m+2H] ²⁺
81a	F	LLHKHN <u>S₅</u> LNL <u>S₅</u> LA	>95	19.97	3.4 [*]	2068.0604	1035.03836 [m+2H] ²⁺
82b	Ac		>95	11.45	15.0 [#]	1575.9613	788.98732 [m+2H] ²⁺
82a	F	LLH <u>S₅</u> HNG <u>S₅</u> NLKLA	>95	17.99	1.0 [*]	2011.9978	1007.00629 [m+2H] ²⁺
82b	Ac		>95	8.96	9.0 [#]	1519.8987	760.95663 [m+2H] ²⁺
83a	F	LL <u>S₅</u> KHN <u>S₅</u> LNLKLA	94	20.01	1.3 [*]	2059.0965	1030.55458 [m+2H] ²⁺
83b	Ac		93	9.87	11.1 [#]	1566.9974	784.50593 [m+2H] ²⁺
84a	F	GELPQ <u>S₅</u> CRM <u>S₅</u> AVF	>95	21.91	3.8 [*]	2135.8977	1067.94917 [m+2H] ²⁺
84b	Ac		>95	15.51	1.0 [#]	1643.7986	822.90404 [m+2H] ²⁺
85a	F	GELPQ <u>S₅</u> F <u>CR</u> <u>S₅</u> CAVF	>95	21.86	6.6 [*]	2151.9257	1076.96994 [m+2H] ²⁺
85b	Ac		>95	15.31	3.7 [#]	1659.8265	830.92059 [m+2H] ²⁺
86a	F	LGQEELELTASLFE <u>S₅</u> AHK <u>S₅</u> V	>95	25.71	0.3 [*]	2304.2366	1153.13063 [m+2H] ²⁺
86b	Ac		>95	22.86	3.7 [#]	2840.3441	1421.18111 [m+2H] ²⁺
87a	F	LGQEELELTASLFE <u>S₅</u> AHK <u>M</u> V	>99	23.99	0.3 [*]	2348.2450	1175.13491 [m+2H] ²⁺
87b	Ac		92	16.55	5.3 [#]	2830.2506	1416.13287 [m+2H] ²⁺
88a	F	LGQEELE <u>S₅</u> TAS <u>S₅</u> FEEAHK <u>M</u> V	93	20.03	0.7 [*]	2338.1515	1170.08579 [m+2H] ²⁺
88b	Ac		>95	20.01	13.5 [#]	2814.2921	1408.15361 [m+2H] ²⁺
89a	F	LGQ <u>S₅</u> LEEE <u>S₅</u> TASLFE <u>E</u> AHK <u>M</u> V	91	21.64	0.2 [*]	2322.1930	1162.10358 [m+2H] ²⁺
89b	Ac		>95	21.88	7.8 [#]	2638.2005	1320.10957 [m+2H] ²⁺

[a] F = Fluorescein-O2OC-; Ac = Acetyliert; B = Biotin-TTDS-

[b] Durch Ringschlussmetathese verbrückte Reste sind durch Unterstrich gekennzeichnet

[c] Anhand der UV-Absorption bei 210 nm bestimmt

[d] Retentionszeit der Synthetisierten Peptide (5-65% MeCN (0.1% TFA), 30 min)

[e] Die Ausbeute der Peptide wurde auf die vom Hersteller des Harzes angegebene Beladungsdichte bezogen und die Peptidmenge anhand der Absorption bei 496 nm (Fluorescein-markierte Peptide; *), ihrer Absorption bei 280 nm ([#]) oder gravimetrisch bestimmt (²⁺)

Peptide aus Abschnitt 5.4.2.

Tabelle 8. Übersicht über die dargestellten Peptide aus Abschnitt 5.4.2.

Eintrag	Terminale mod. ^[a]	Sequenz ^[b]	Reinheit [%] ^[c]	HPLC (t _R , [min])	Ausbeute [%] ^[f]	HRMS (berechnet)	HRMS (gefunden)
90	Z	XDDGKEQFLYHLLSFNAVK	> 95	16.72 ^[d]	0.5	1303.5812	1303.5872[m+2H] ²⁺
91	F	DDE-S ₅ -EQF-S ₅ -YHLLSFNAV	> 95	25.50 ^[d]	5.0	1319.5778	1319.5805[m+2H] ²⁺
92	F	DDE-S ₄ -EQF-S ₅ -YHLLSFNAV	> 95	20.79 ^[d]	16.5	1298.5470	1298.5546[m+2H] ²⁺
93	F	DDE-S ₆ -EQF-S ₅ -YHLLSFNAV	> 95	20.50 ^[d]	20.1	1312.5696	1312.5700[m+2H] ²⁺
94	F	DDE-S ₆ -EQF-S ₅ -YHLLSFNAV	> 95	19.23 ^[d]	29.0	1073.5282	1073.5296[m+2H] ²⁺
95	F	DE-R ₈ -EQFLYH-S ₅ -LSFNNAV	> 95	20.67 ^[d]	3.9	1326.5856	1326.5851[m+2H] ²⁺
96	F	DDE-S ₅ -EQF-S ₅ -YHLL-SFN-AsMe-V	> 95	20.81 ^[d]	5.6	1319.5778	1319.5784[m+2H] ²⁺
97	F	DDE-S ₅ -EQF-S ₅ -YHLL-S ₅ -SFN-S ₅ -V	> 95	20.76 ^[e]	0.2	1338.5845	1338.5845[m+2H] ²⁺
98	F	DDE-S ₅ -EQF-B ₅ -YHLLSF-S ₈ -AV	> 95	25.75 ^[e]	1.6	1352.1218	1352.1222[m+2H] ²⁺
99	F	DDE-S ₅ -EQF-B ₅ -YHLL-B ₅ -SFN-S ₅ -V	> 95	20.98 ^[e]	1.5	1378.6169	1378.6229[m+2H] ²⁺
100A	F	DDE-S ₅ -EQF-B ₅ -YH-B ₅ -LS-S ₅ -NAV	> 95	18.67 ^[e]	0.2	1340.6013	1340.6052[m+2H] ²⁺
100B	F	DDE-S ₅ -EQF-B ₅ -YH-B ₅ -LS-S ₅ -NAV	> 95	19.24 ^[e]	0.2	1340.6013	1340.6056[m+2H] ²⁺

[a] F = N-terminal Fluorescein-O20c; Z = Fluorescein an der Seitenkette des C-terminalen Lysins

[b] Durch Ringschlussmetathese verbrückte Reste sind durch Unterstrich gekennzeichnet

[c] Anhand der UV-Absorption bei 210 nm bestimmt

[d] Retentionszeit der synthetisierten Peptide (05–65% MeCN (0.1% TFA), 30 min) [e] (10–90% MeCN (0.1% TFA), 30min)

[f] Die Ausbeute der Peptide wurde auf die vom Hersteller des Harzes angegebene Beladungsdichte bezogen und die Peptidmenge anhand der Fluorescein-Absorption bei 496 nm bestimmt

7.3.4 Peptidquantifizierung

Die Konzentration von Fluorescein-markierten Peptiden wurde anhand ihrer UV-Absorption in 20 mM Phosphatpuffer (pH 8.5) bei 496 nm ($\epsilon = 77.000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) bestimmt. Die Konzentration acetylierter Peptide wurde gravimetrisch oder mittels UV-Absorption ihrer Trp- und Tyr-Reste bei 280 nm ermittelt.

7.3.5 Bestimmung des Sekundärstrukturanteils mittels CD-Spektroskopie

Der α -helikalen Charakter der synthetisierten Peptide wurde anhand von CD-Spektren ermittelt. Die Peptide wurden in 20 mM PBS puffer (pH 8.0) in einer Konzentration von 50 μM gelöst und Spektren in einem Wellenlängenbereich von 190 nm bis 260 nm aufgenommen (kontinuierlicher Modus mit 50 nm/min und Messpunkten alle 0.1 nm). Für jede Probe wurde der Mittelwert aus fünf verschiedenen Messungen gebildet. Die Helizität wurde anhand der charakteristischen Elliptizität bei 222 nm errechnet:²⁸¹

$$\% \text{ helikaler Anteil} = 100 [Q_{222}^{obs} / (39,500(1 - 2.57/n))]$$

Gleichung 1: Berechnung des helikalen Anteils der Peptide anhand der Zahl der Aminosäurereste n und die Elliptizität bei 222 nm Q_{222}^{obs} .

7.4 Material und Geräte biologischer Experimente

7.4.1 Laborgeräte

pH-Meter	Schott, CG840
Pipetten	Eppendorf
Reinstwassersystem	Millipore, Milli-Q Advantage A-10
Sterilbank	NuncNalge, Sterilbank Microflow
Vortexer	Carl Roth, Vortex Genie 1
Zentrifugen	Eppendorf, Minispin Centrifuge Eppendorf, 5415R
Plattenleser	Tecan, Safire 2
CD-Spektrometer	Jasco GmbH, J-815

Fluoreszenzspektrometer	Jasco GmbH, FP6500
Gelelektrophorese System	BioRad, Miniprotean 3
Fluoreszenz-Imaging System	LI-COR Biosciences, Odyssey
Blot Transferkammer	BioRad, Trans-Blot

7.4.2 Verbrauchsmaterial

Reaktionsgefäße (0.5, 1.5, 2.0 mL)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (15, 50 mL)	Sarstedt
Entsalzungssäule PD-10	GE Healthcare
Entsalzungssäule NAP-5	GE Healthcare
Zentrifugen Filtereinheiten (0.5 und 15 mL)	Merck Millipore, Amicon Ultra
Coomassie Brilliant Blau G-250	Serva
Alkalische Phosphatase	Roche
GDP, GppNHp	Sigma
mant-GDP, mant-GppNHp	Jena Bioscience
NHS-Fluorescein	Sigma
Streptavidin Magnetic Beads (Dynabeads® Magnetic Beads M280)	Invitrogen
Bradford-Reagenz	BioRad
NP40	Sigma
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma
384-Loch Platten	Corning
Küvetten	Sarstedt
PVDF-Transfermembran	Thermo Fisher Scientific
Whatmann 3MM Papier	Schleicher & Schüll
384-Loch-Platten (small volume, black, flat-bottom, non-binding)	Greiner

7.4.3 Antikörper

Anti-Rab8	Cell signaling (Rab8(D22D8) XP™ Rabbit mAb; #6975)
Anti-Kaninchen IgG	Thermo Scientific ((H+L) HRP-Konjugat)

7.4.4 Puffer und Lösungen

PBS (Phosphate buffered saline)	137 mM NaCl 2.7 mM KCl 11 mM Na ₂ HPO ₄ 1.8 mM KH ₂ PO ₄ pH = 7.4
TBS	20 mM Tris-HCl 150 mM NaCl pH = 7.4
TBST	20 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 0.01% tween (v/v) pH = 7.4
FP-Assay Puffer (GDP/GppNHp)	25 mM Hepes 150µM NaCl 1mM MgCl ₂ 1mM TCEP 1µM GDP/GppNHp 0.01% tween (v/v) pH = 7.5
FP-Assay Puffer (nukleotidfrei)	20 mM Hepes 50 mM NaCl 1 mM TCEP

7 Experimentarteil

	0.01% tween(v/v) pH = 7.5
FP-Assay Puffer (GDP/GppNHp) (bei Disulfid-verbrückten Peptiden)	25 mM Hepes 150µM NaCl 1mM MgCl ₂ 1µM GDP/GppNHp 0.01% tween (v/v) pH = 7.5
Puffer für Kinetiken	50mM NaCl, 20mM Hepes 5mM MgCl ₂ 1mM TCEP 1nM mantGDP pH = 7.5
5× SDS-PAGE Probenpuffer	250 mM Tris-Hcl pH = 6.8 50% Glycerin (v/V) 350 mM SDS 360 µM Bromphenol Blau 250 mM DTT
SDS-PAGE Laufpuffer	250 mM Glycin 250 mM Tris 35 mM SDS
Coomassie-Lösung	0.25% Coomassie Brilliant Blau G-250 (w/v) 45% Methanol 10% Essigsäure (v/v)
Entfärber-Lösung	30% Methanol (v/v)

	10% Essigsäure (v/v)
Transferpuffer	25 mM Tris-HCl 0.2 M Glycin MeOH/H ₂ O, 1/4, v/v
Lyse-Puffer	150 mM NaCl 20 mM Tris pH 7.6 0.5% NP40 Alternative Protease Inhibitor Cocktail

7.5 Biochemische und biophysikalische Methoden

7.5.1 Präparativer Nukleotidaustausch zu GppNHp und mant-GppNHp

Nach ihrer Aufreinigung sind GTPasen aufgrund ihrer GTP-Hydrolyseaktivität mit GDP assoziiert. Um die hohe Affinität der GTPase zum Nukleotid zu reduzieren, wurde in einem ersten Schritt das Mg²⁺ entzogen. Dazu wurde ein fünffacher Überschuss von EDTA zugegeben und für 1 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Proteinlösung durch Filtration über eine Entsalzungssäule geeigneter Größe mit einem Elutionspuffer bestehend aus 20 mM HEPES (pH 7.5), 50 mM NaCl, 1 mM TCEP entsalzt. Um Präzipitation zu vermeiden wurde die Proteinkonzentration mit Elutionspuffer auf <100 µM eingestellt. Anschließend werden NH₄SO₄ (200 mM), ZnCl₂ (500 µM), alkalische Phosphatase (5 U/mg GTPase) sowie ein dreifacher Überschuss GppNHp bzw. mant-GppNHp zugesetzt und für 10 h am Rotator bei 4 °C inkubiert. Die GTPase wurde mittels Filtration über eine Entsalzungssäule umgepuffert (Puffer: 25 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM TCEP, 1mM MgCl₂, 1 µM Nukleotid), gegebenenfalls konzentriert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Effizienz des Nukleotidaustauschs wurde mittels analytischer Umkehrphasen-HPLC überprüft.

7.5.2 Herstellung nukleotidfreier GTPasen

Zur Entfernung des Mg²⁺ wurde die GTPase mit einem fünffachen Überschuss von EDTA zugegeben und für 1 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Proteinlösung durch Filtration über eine Entsalzungssäule geeigneter Größe mit einem Elutionspuffer bestehend aus 20 mM

HEPES (pH 7.5), 50 mM NaCl, 1 mM TCEP entsalzt. Um Präzipitation zu vermeiden, wurde die Proteinkonzentration mit Elutionspuffer auf $<100 \mu\text{M}$ eingestellt. Anschließend werden NH_4SO_4 (200 mM), ZnCl_2 (500 μM), alkalische Phosphatase (5 U/mg GTPase) zugesetzt und für 10 h am Rotator bei 4 °C inkubiert. Das Protein wurde gegebenenfalls konzentriert und direkt eingesetzt. Die Effizienz des Nukleotidaustauschs wurde mittels analytischer Umkehrphasen-HPLC überprüft.

7.5.3 Präparativer Nukleotidaustausch zu GDP und mant-GDP

Die GTPase wurde mit einem fünffachen Überschuss von EDTA und dem zehn- bis zwanzigfachen Überschuss an GDP bzw. mant-GDP für 2 h bei RT inkubiert. Die GTPase wurde mittels Filtration über eine Entsalzungssäule umgepuffert (Puffer: 25 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM TCEP, 1 mM MgCl_2 , 1 μM Nukleotid), gegebenenfalls konzentriert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Effizienz des Nukleotidaustauschs wurde mittels analytischer Umkehrphasen-HPLC überprüft.

7.5.4 Analytische Umkehrphasen-HPLC von GTPasen

Die Effizienz des Nukleotidaustauschs wurde mittels analytischer Umkehrphasen-HPLC kontrolliert. Die Auftrennung gewöhnlicher Guaninnukleotide (GDP, GTP, GppNHp) erfolgte mittels isokratischer Elution (Puffer: 50 mM Kaliumphosphat pH , 10 mM Tetrabutylammoniumbromid, 8 % (v/v) Acetonitril, Flussrate 0.5 mL/min über 12 min). Die Detektion der Nukleotide erfolgte bei einer Wellenlänge von 256 nm.

Die Auftrennung fluoreszenzmarkierter Nukleotide (mantGDP, mantGppNHp) erfolgte ebenfalls isokratisch mit anderem Laufmittel (Puffer: 50 mM Kaliumphosphat pH , 10 mM Tetrabutylammoniumbromid, 16 % (v/v) Acetonitril, Flussrate 0.5 mL/min über 12 min). Die Detektion erfolgte bei den Wellenlängen 256 nm (Guanin) und 350 nm (mant-Gruppe).

7.5.5 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Trennung der zur analysierenden Proteine wurde denaturierende Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli durchgeführt.²⁹⁵ Proteine wurden in einem Sammelgel konzentriert und in einem 10 – 15%-igen Trenngel nach Molekulargewicht und Ladung getrennt. Sammel- und Trenngel wurden gemäß der in Tabelle 4 angegebenen Verhältnisse gemischt und sukzessive in einer BioRad Mini-Protean-II System Kassette gegossen.

Zur Probenvorbereitung wurden die Proben mit dem entsprechenden Volumen an SDS-PAGE Probenpuffer(5x) versetzt und fünf Minuten auf 95°C zur Denaturierung des Proteins und quantitativer Bindung von SDS erhitzt. Die Trennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80 V. Das Molekulargewicht der Proteine wurde anhand eines Molekulargewichtstandards (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, *Fermentas*) bestimmt. Die getrennten Proteine wurden mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Dazu wurden die Gele in SDS-PAGE Färbelösung aufgekocht. Anschließend wurden die Gele durch kurzes Aufkochen in 10%-iger Essigsäure entfärbt. Alternativ erfolgte ein Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran.

Tabelle 4. Zusammensetzung eines 15%-igen Polyacrylamidgels. Gele abweichender Polyacrylamidgehalte wurden mit entsprechendem Acrylamid/Bisacrylamid-Anteil hergestellt.

	Sammelgel	Trenngel
Sammelgelpuffer	0.35 mL	-
Trenngelpuffer	-	1.1 mL
10% SDS (w/v)	27 µL	45 µL
30% Acrylamid/ Bisacrylamid (37.5/1) (w/v)	0.45 mL	2.2 mL
10% APS (w/v)	27 µL	45 µL
TEMED	3 µL	2 µL
Wasser	1 mL	1 mL

7.5.6 Proteinexpression und -reinigung

7.5.6.1 Ras-Proteine

H-Ras, K-Ras und N-Ras wurden von Frau Christine Novak entsprechend etablierter Protokolle exprimiert und aufgereinigt.^{149,296}

7.5.6.2 Rab-Proteine

Rab9a₁₋₂₀₃ und Rab11a₁₋₂₁₈ wurden von der Dortmund Protein Facility (<http://www.mpi-dortmund.mpg.de/misc/dpf>) in pOPINF Vektoren (N-terminal His₆-tag gefolgt von einer Schnittstelle für PreScission Protease) mittels *infusion cloning method*²⁹⁷ kloniert. Die Proteine wurden in *Escherichia coli* BL21 (DE3) exprimiert. Die Induktion erfolgte mit 0.3 mM Isopropyl-β-dithiogalactopyranosid bei 25 °C für 24 h. Rab9a und Rab11a wurden aus dem Bakterienlysat sukzessive durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie gefolgt von einer

Größenausschlusschromatographie in 20 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM TCEP, 1 μM GDP aufgereinigt. Der His₆-tag wurde mit PreScission Protease entfernt.

Rab1b₃₋₁₇₄, Rab5a₂₋₂₁₆, Rab6a₂₋₂₁₁, Rab7a₂₋₂₀₇, Rab8a_{fl}, Rab8a₆₋₁₇₆, OCRL1₅₃₉₋₉₀₁ und Rabin8 wurden von Frau Nathalie Bleimling entsprechend etablierter Protokolle in *Escherichia coli* BL21 (DE3) exprimiert und durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie gefolgt von Größenausschlusschromatographie aufgereinigt.^{162,163,268,276}

7.5.7 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentration von Proteinen wurde durch UV-Absorption oder der Methode nach Bradford durchgeführt.

7.5.7.1 Proteinbestimmung durch UV-Absorption

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch UV-Detektion bei 280 nm. Der Proteingehalt wurde anhand des für die Proteine berechneten Extinktionskoeffizienten gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz ermittelt.

7.5.7.2 Bradford

Der Proteingehalt einer Lösung wurde photometrisch unter Verwendung verbrauchsfertiger Bradford-Reagenz (Bio-Rad) durchgeführt. Nach 5 minütiger Inkubation wurde dazu die Absorption des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 bei 595 nm bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte anhand einer für BSA erstellten Eichgerade.

7.5.8 Unspezifische Markierung mittels NHS-Fluorescein

Die Proteine wurden in einem Puffer aus 20 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM TCEP und 1 mM MgCl₂ auf eine finale Konzentration zwischen 2 – 4 mg/mL verdünnt und für 16 h bei 4 °C mit NHS-Fluorescein (15 eq, 21 mM in DMSO) inkubiert. Anschließend wurde das überschüssige NHS-Fluorescein durch Filtration über NAP-5 Säule (Sephadex G-25, DNA Grade, GE Healthcare) entfernt.

7.5.9 Herstellung von Zelllysaten

Adhärente HCT116 wurden bei Konfluenz von 90 - 100% mit TBS gewaschen und nach 5 min Kühlen auf Eis mit einem Schaber vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst und in einer geringen Menge Lysepuffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris (pH 7.5), 1 mM PMSF und 0.5% NP40) suspendiert. Die Zellen wurden durch Behandlung mit Ultraschall (3× 15 s bei 40%) aufgeschlossen und unlösliche Bestandteile mittels Zentrifugation (20 min, 16,900 × *g*) entfernt. Das erhaltene Lysat wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C gelagert.

7.5.10 Präzipitationsexperiment (Pull-Down)

Mit Streptavidin beschichtete, magnetische Kunststoffkügelchen (Dynabeads M280, Invitrogen) wurden mit einer Lösung der biotinylierten Peptide (100 µL, 10 µM) für 1 h bei RT inkubiert und mehrfach mit TBS + 0.01% Tween-20 gewaschen. Anschließend wurde Lysat von HCT116 Zellen (100 µL, 5.4 g/L) angereichert mit Rab8a (0.9 Gew.-%, 1µM) zu den Kunststoffkügelchen gegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Die Kügelchen wurden mehrfach mit TBS + 0.01% Tween-20 gewaschen und die gebundenen Proteine durch Erhitzen in SDS-Gel-Beladungspuffer (95°C, 10 min) eluiert. Nach der Auftrennung mittels SDS-PAGE wurden die Gele auf eine PVDF-Membran (Millipore) elektrotransferiert. Rab8a wurde mit einem spezifischen Antikörper (Cell Signaling) detektiert.

7.5.11 Elektrotransfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran (Western-Blot)

Für den Elektrotransfer wurde eine Halbtrockenzelle verwendet, bei der das Polyacrylamid-Gel und die Membran zwischen zwei mit Transferpuffer getränkte Filterpapiere gelegt und dann zwischen zwei Plattenelektroden eingeklemmt wurden. Der Elektrotransfer der Proteine auf die Membran erfolgte unter Verwendung einer konstanten Spannung von 25 V für 60 min.

7.5.12 Detektion mittels fluoreszenz-markierten Antikörper

Zunächst wurden freie Bindungsstellen auf der PVDF-Membran durch Inkubation in Blockierpuffer (5% BSA in TBST) für 1h bei RT abgesättigt. Der Rab8a spezifische Primärantikörper wurde in

Blockierpuffer verdünnt (1: 1000) und die Membran für 12h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde 3 × 10 min mit TBS + 0.01% Tween-20 gewaschen und die Membran für 1 h bei RT mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (HRP-rabbit, 1:10 000 in TBST mit 5% Milchpulver) behandelt. Nach erneutem Waschen (2 × 10 min mit TBS + 0.01% Tween-20) wurde das Fluoreszenzsignal an einem Odyssey Fc Imager (LI-COR Biosciences) ausgelesen.

7.5.13 Fluoreszenzpolarisations Assay zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten

Fluoreszenzpolarisationsmessungen wurden mit einem Safarief² Plattenleser (*Tecan*) in 384-Loch-Platten (small volume, black, flat-bottom, non-binding, *Greiner*) durchgeführt. Die Proteine wurden seriell in einem geeigneten Puffer für nukleotid-gebundene bzw. nukleotid-freie GTPasen verdünnt, mit 50 nM des Fluorescein-markierten Peptids versetzt und 1 h bei RT inkubiert. Die Fluoreszenzpolarisation wurde anschließend bei RT und einer Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = 470$ nm und einer Emissionswellenlänge $\lambda_{em} = 525$ nm ausgelesen.

Initiale Screens wurden jeweils als Einzelmessungen durchgeführt und die Dissoziationskonstanten (K_d) mittels nicht-linearer Regression in der Software Prism 5.0 (*Graphpad*) ermittelt.²⁹⁸

Die exakte Affinitätsbestimmung relevanter Peptide erfolgte in Form von Triplikaten. Nach einer Korrektur entsprechend der Änderung der Fluoreszenzintensität im Bindungszustand wurde aus den Fluoreszenzanisotropie Daten der gebundene Anteil bestimmt (**Gleichung 2**). Entsprechend dem Massenwirkungsgesetz wurde anschließend unter Annahme einer einzigen Bindungsstelle die Dissoziationskonstante K_d als einzige Variable durch nicht-lineare Regression in Prism 5.0 (*Graphpad*) errechnet (**Gleichung 3**).²⁹⁹ In Fällen, in denen aufgrund zu geringer Löslichkeit der nukleotid-freien Proteine kein Plateau erreicht werden konnte, wurden Plateau-Punkte anhand vergleichbarer Daten extrapoliert.

$$\text{Gleichung 2: } \text{gebundener Anteil} = \frac{A - A_{\text{frei}}}{A - A_{\text{frei}} + Q(A_{\text{gebunden}} - A)}$$

A: beobachtete Anisotropie; A_{frei} : Anisotropie des freien Fluorophors; A_{gebunden} Anisotropie des gebundenen Fluorophors; Q: Verhältnis der Fluoreszenzintensität im freien und gebundenen Zustand

$$\text{Gleichung 3: } \text{gebundener Anteil} = \frac{K_d + L_T + c_{\text{Protein}} - \sqrt{(K_d + L_T + c_{\text{Protein}})^2 - 4L_T c_{\text{Protein}}}}{2L_T}$$

K_d : Dissoziationskonstante; L_T : Konzentration des markierten Peptids; c_{Protein} : Proteinkonzentration

7.5.14 **Kompetition im Fluoreszenzpolarisations-Assay**

In einer Lösung von 50 nm unspezifisch mit Fluorescein markiertem OCRL-1 und 10 μM Rab8a(GppNHp) wurde acetyliertes Peptid seriell verdünnt und für 1 h bei RT inkubiert. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) wurde mittels nicht-linearer Regression in der Software Prism 5.0 (*Graphpad*) errechnet.²⁹⁸

7.5.15 **Bestimmung der Nukleotidaustauschkinetiken**

Um den Einfluss der Peptide auf den Nukleotidaustausch von Rab8 zu untersuchen, wurden Langzeitfluoreszenzmessungen durchgeführt. Dazu wurde Rab8 mit dem Fluoreszenz-markierten Nukleotidanalogen mant-GDP beladen und die Verdrängung durch freies GDP verfolgt. Typischerweise wurden dazu in einer Quartzküvette 100 μL Ansätze gemessen. Um den Einfluss der acetylierten Peptide auf die Dissoziationskinetik zu bestimmen, wurde eine Mischung aus Rab8(mant-GDP) (1 μM) und GDP (500 μM) vorgelegt. Anschließend wurde das jeweilige acetylierte Derivat zugegeben (100 μM) und die Abnahme des charakteristischen mant-Fluoreszenzsignals bei 20 °C verfolgt ($\lambda_{\text{ex}} = 384 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$).

Um dagegen den Einfluss auf die GEF-Aktivität von Rabin8 zu bestimmen, wurde Rab8(mant-GDP) (2 μM) mit der GEF-Domäne von Rabin8 (9 μM) und dem acetylierten Peptid für 30 min bei RT vorinkubiert. Die Nukleotidaustauschreaktion wurde durch Zugabe von GDP (500 μM) gestartet und die Abnahme des charakteristischen mant-Fluoreszenzsignals bei 20 °C verfolgt.

8 Abkürzungsverzeichnis

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
All	Allyl
Alloc	Allyloxycarbonyl
APS	Ammoniumpersulf
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl-
CAPRI	<i>Calcium-promoted RAS inactivater</i>
CD	Circulardichroismus
DCM	Dichlormethan
DIC	<i>N, N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIEA	<i>N, N'</i> -Diisopropylethylamin
DMF	<i>N, N'</i> --Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDT	1,2-Ethandithiol
EGF	<i>Endothelial growth factor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>Extracellular regulated kinase</i>
ESI	Elektro-Spray-Ionisation
FIP	<i>Family interacting protein</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
Fmoc-OSu	<i>N</i> -(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)-succinimid
FP	Fluoreszenzpolarisation
FTI	Farnesyltransferase Inhibitor
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GAP1 ^{IP4BP}	<i>GAP1 InsP4-binding protein</i>
GCC185	<i>GRIP and coiled-coil domain-containing protein</i>
GDI	Guaninnukleotiddissoziationsinhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guaninnukleotidaustauschfaktor
GppNHp	5'-Guanylylimidodiphosphat
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor

8 Abkürzungsverzeichnis

GTP	Guanosintriphosphat
HATU	2-(1 <i>H</i> -7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HBS	Wasserstoffbrückenersatz (<i>hydrogen bond surrogate</i>)
HCl	Salzsäure
HCTU	(2-(6-Chloro-1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminiumhexafluorophosphat
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonsäure
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HRMS	<i>High resolution mass spectroscopy</i>
HTS	<i>High-throughput screening</i>
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
IPTG	Isopropyl-β-dithiogalactopyranosid
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
JNK	c-Jun <i>N</i> -terminale Kinase
K _D	Dissoziationsgleichgewichtskonstante
mant	Mehtylantraniloyl
MAP	Mitogen-aktivierendes Protein
MAPK	<i>Ras mitogen activated protein kinase</i>
MeCN	Acentonitril
MEK	MAPK/ERK-Kinase
Mmt	4-Monomethoxytrityl
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
Mtt	4-Methyltrityl
NCS	<i>N</i> -Chlorsuccinimid
NF1	Neurofibromin1
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
O ₂ Oc	8-Amino-3,6-dioxooctansäure
ORCL	<i>Oculocerebrorenal syndrome protein</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>

8 Abkürzungsverzeichnis

PLCε	Phospholipase Cε
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPI	Protein–Protein-Interaktion
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
R6IP1	<i>Rab6-interacting protein 1</i>
Rab	<i>Ras-like proteins in brain</i>
Raf	<i>Rabid fibrosarcoma</i>
RalGDS	<i>Ral guanine nucleotide dissociation stimulator</i>
Ran	<i>Ras-like nuclear protein</i>
Rap	<i>Ras related proteins</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RasAL	<i>RasGAP-activating-like</i>
RasGRF	<i>Ras-specific guanyl nucleotide releasing factor</i>
RasGRP	<i>Ras-specific guanine-nucleotide-releasing protein</i>
RasSF	<i>Ras association domain-containing famil</i>
RBD	Ras-bindende Domäne
REP	Rab-Eskortprotein
Rheb	<i>Ras homolog enriched in brain</i>
Rho	Ras Homolog
RILP	<i>Rab interacting lysosomal protein</i>
RIN1	<i>Ras and Rab interactor 1</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOS	<i>Son of sevenless</i>
SPPS	<i>Solid phase peptide synthesis</i>
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
SynGAP	<i>Synaptic RasGAP</i>
TBABr	Tetrabutylammoniumbromid
TBC-	Tre2/Bub2/Cdc16-Domäne
Domäne	
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TCR	T-Zellenrezeptor

8 Abkürzungsverzeichnis

TECEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -Tetramethylethylenediamin
TEV-	<i>Tabacco Etch Virus Nla</i> -Protease
Protease	
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIAM1	<i>T lymphoma invasion and metastasis-inducing 1</i>
TIS	Triisopropylsilan
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trt	Trityl
TTDS	[N1-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan-succinylsäure
wt	Wildtyp
μw	Mikrowelle

Aminosäuren wurden gemäß den Empfehlungen der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) and the International Union of Biochemistry (IUB) im Ein- bzw. Dreibuchstaben-Code abgekürzt.³⁰⁰

9 Literatur

1. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell* **144**, 646–674 (2011).
2. Verdine, G. L. & Walensky, L. D. The Challenge of Drugging Undruggable Targets in Cancer: Lessons Learned from Targeting BCL-2 Family Members, *Clin. Cancer Res.* **13**, 7264–7270 (2007).
3. Jubb, H. Higuieruelo, A. P. Winter, A. & Blundell, T. L. Structural biology and drug discovery for protein-protein interactions, *Trends Pharmacol. Sci.* **33**, 241–248 (2012).
4. Daten wurden der COSMIC Database entnommen (<http://www.sanger.ac.uk/cosmic>). Siehe. Forbes, S. A. *et al.* COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, *Nucleic Acids Res.* **39**, D945-50 (2011).
5. Cromm, P. M. Spiegel, J. Grossmann, T. N. & Waldmann, H. Direct Modulation of Small GTPase Activity and Function, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **54**, 13516–13537 (2015).
6. Stephen, A. G. Esposito, D. Bagni, R. K. & McCormick, F. Dragging Ras Back in the Ring, *Cancer Cell* **25**, 272–281 (2014).
7. Zinzalla, G. & Thurston, D. E. Targeting protein-protein interactions for therapeutic intervention: a challenge for the future, *Fut. Med. Chem.* **1**, 65–93 (2009).
8. Horton, N. & Lewis, M. Calculation of the free energy of association for protein complexes, *Protein Sci.* **1**, 169–181 (1992).
9. Nevola, L. & Giralt, E. Modulating protein-protein interactions: the potential of peptides, *Chem. Commun. (Camb.)* **51**, 3302–3315 (2015).
10. Janin, J. Bahadur, R. P. & Chakrabarti, P. Protein-protein interaction and quaternary structure, *Q. Rev. Biophys.* **41**, 133–180 (2008).
11. Moreira, I. S. Fernandes, P. A. & Ramos, M. J. Hot spots--a review of the protein-protein interface determinant amino-acid residues, *Proteins* **68**, 803–812 (2007).
12. Surade, S. & Blundell, T. L. Structural biology and drug discovery of difficult targets: the limits of ligandability, *Chem. Biol.* **19**, 42–50 (2012).

13. Wells, J. A. & McClendon, C. L. Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein-protein interfaces, *Nature* **450**, 1001–1009 (2007).
14. Milroy, L.-G. Grossmann, T. N. Hennig, S. Brunsveld, L. & Ottmann, C. Modulators of Protein–Protein Interactions, *Chem. Rev.* **114**, 4695–4748 (2014).
15. Watkins, A. M. & Arora, P. S. Structure-based inhibition of protein-protein interactions, *Eur. J. Med. Chem.* **94**, 480–488 (2015).
16. Mueller, R. *et al.* Iterative experimental and virtual high-throughput screening identifies metabotropic glutamate receptor subtype 4 positive allosteric modulators, *J. Mol. Model.* **18**, 4437–4446 (2012).
17. Hajduk, P. J. & Greer, J. A decade of fragment-based drug design: strategic advances and lessons learned, *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 211–219 (2007).
18. Murray, C. W. & Rees, D. C. The rise of fragment-based drug discovery, *Nat Chem* **1**, 187–192 (2009).
19. Arkin, M. R. Tang, Y. & Wells, J. A. Small-Molecule Inhibitors of Protein-Protein Interactions: Progressing toward the Reality, *Chem. Biol.* **21**, 1102–1114 (2014).
20. London, N. Raveh, B. & Schueler-Furman, O. Druggable protein–protein interactions – from hot spots to hot segments, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **17**, 952–959 (2013).
21. Pelay-Gimeno, M. Glas, A. Koch, O. & Grossmann, T. N. Structure-Based Design of Inhibitors of Protein-Protein Interactions: Mimicking Peptide Binding Epitopes, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **54**, 8896–8927 (2015).
22. Azzarito, V. Long, K. Murphy, N. S. & Wilson, A. J. Inhibition of α -helix-mediated protein–protein interactions using designed molecules, *Nature Chem.* **5**, 161–173 (2013).
23. Jayatunga, M. K. P. Thompson, S. & Hamilton, A. D. α -Helix mimetics: outwards and upwards, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **24**, 717–724 (2014).
24. Houk, K. N. Leach, A. G. Kim, S. P. & Zhang, X. Binding affinities of host-guest, protein-ligand, and protein-transition-state complexes, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **42**, 4872–4897 (2003).
25. J. Martin Scholtz & and Robert L. Baldwin. The Mechanism of alpha-Helix Formation by Peptides, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**, 95–118 (1992).

26. Craik, D. J. Fairlie, D. P. Liras, S. & Price, D. The future of peptide-based drugs, *Chem. Biol. Drug. Des.* **81**, 136–147 (2013).
27. Glas, A. *et al.* Constrained Peptides with Target-Adapted Cross-Links as Inhibitors of a Pathogenic Protein-Protein Interaction, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **53**, 2489–2493 (2014).
28. Fisk, J. D. Powell, D. R. & Gellman, S. H. Control of Hairpin Formation via Proline Configuration in Parallel β -Sheet Model Systems, *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 5443–5447 (2000).
29. Haque, T. S. Little, J. C. & Gellman, S. H. "Mirror image" reverse turns promote β -hairpin formation, *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 4105–4106 (1994).
30. Nowick, J. S. Smith, E. M. & Pairish, M. Artificial small beta-sheets, *Chem. Soc. Rev.* **25**, 401–415 (1996).
31. Venkatraman, J. Shankaramma, S. C. & Balaram, P. Design of Folded Peptides, *Chem. Rev.* **101**, 3131–3152 (2001).
32. Haque, T. S. Little, J. C. & Gellman, S. H. Stereochemical Requirements for β -Hairpin Formation: Model Studies with Four-Residue Peptides and Depsipeptides, *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 6975–6985 (1996).
33. Gibbs, A. C. Bjorndahl, T. C. Hodges, R. S. & Wishart, D. S. Probing the Structural Determinants of Type II' β -Turn Formation in Peptides and Proteins, *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 1203–1213 (2002).
34. Athanassiou, Z. *et al.* Structural mimicry of retroviral tat proteins by constrained beta-hairpin peptidomimetics: ligands with high affinity and selectivity for viral TAR RNA regulatory elements, *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 6906–6913 (2004).
35. Favre, M. Moehle, K. Jiang, L. Pfeiffer, B. & Robinson, J. A. Structural Mimicry of Canonical Conformations in Antibody Hypervariable Loops Using Cyclic Peptides Containing a Heterochiral Diproline Template, *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 2679–2685 (1999).
36. Fasan, R. *et al.* Structure-activity studies in a family of beta-hairpin protein epitope mimetic inhibitors of the p53-HDM2 protein-protein interaction, *Chembiochem* **7**, 515–526 (2006).
37. Masterson, L. R. *et al.* Nonstereogenic alpha-aminoisobutyryl-glycyl dipeptidyl unit nucleates type I' beta-turn in linear peptides in aqueous solution, *Biopolymers* **88**, 746–753 (2007).

38. Langenhan, J. M. Guzei, I. A. & Gellman, S. H. Parallel sheet secondary structure in beta-peptides, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **42**, 2402–2405 (2003).
39. Freire, F. & Gellman, S. H. Macrocyclic design strategies for small, stable parallel beta-sheet scaffolds, *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 7970–7972 (2009).
40. Tsang, K. Y. Diaz, H. Graciani, N. & Kelly, J. W. Hydrophobic Cluster Formation Is Necessary for Dibenzofuran-Based Amino Acids to Function as .beta.-Sheet Nucleators, *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 3988–4005 (1994).
41. Kawano, K. *et al.* Antimicrobial peptide, tachyplesin I, isolated from hemocytes of the horseshoe crab (*Tachyplesus tridentatus*). NMR determination of the beta-sheet structure, *J. Biol. Chem.* **265**, 15365–15367 (1990).
42. DeLano, W. L. Ultsch, M. H. [Nachname nicht vorhanden], A. M. de, Vos & Wells, J. A. Convergent Solutions to Binding at a Protein-Protein Interface, *Science* **287**, 1279–1283 (2000).
43. Santiveri, C. M. León, E. Rico, M. & Jiménez, M. A. Context-dependence of the contribution of disulfide bonds to beta-hairpin stability, *Chemistry* **14**, 488–499 (2008).
44. Almeida, A. M. Li, R. & Gellman, S. H. Parallel β -sheet secondary structure is stabilized and terminated by interstrand disulfide cross-linking, *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 75–78 (2012).
45. Fasan, R. *et al.* Using a beta-hairpin to mimic an alpha-helix: cyclic peptidomimetic inhibitors of the p53-HDM2 protein-protein interaction, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **43**, 2109–2112 (2004).
46. Santiveri, C. M. & Jiménez, M. A. Tryptophan residues: scarce in proteins but strong stabilizers of β -hairpin peptides, *Biopolymers* **94**, 779–790 (2010).
47. Nowick, J. S. *et al.* An Artificial β -Sheet Comprising a Molecular Scaffold, a β -Strand Mimic, and a Peptide Strand1, *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 2764–2765 (1996).
48. Lingard, H. *et al.* Diphenylacetylene-Linked Peptide Strands Induce Bidirectional β -Sheet Formation, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **53**, 3650–3653 (2014).
49. Xin, D. Perez, L. M. Ioerger, T. R. & Burgess, K. A multifaceted secondary structure mimic based on piperidine-piperidinones, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **53**, 3594–3598 (2014).
50. Hanold, L. E. *et al.* Inhibiting EGFR dimerization using triazolyl-bridged dimerization arm mimics, *PLoS ONE* **10**, e0118796 (2015).

51. Bullock, B. N. Jochim, A. L. & Arora, P. S. Assessing Helical Protein Interfaces for Inhibitor Design, *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 14220–14223 (2011).
52. Barazza, A. *et al.* Bioactive N-terminal undecapeptides derived from parathyroid hormone: the role of alpha-helicity, *J. Pept. Res.* **65**, 23–35 (2005).
53. Toniolo, C. *et al.* Structures of peptides from alpha-amino acids methylated at the alpha-carbon, *Biopolymers* **33**, 1061–1072 (1993).
54. Dehner, A. *et al.* Solution Structure, Dimerization, and Dynamics of a Lipophilic α /310-Helical, C α -Methylated Peptide. Implications for Folding of Membrane Proteins, *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 6678–6686 (2001).
55. Kundu, R. *et al.* Hybrid organic-inorganic inhibitors of a PDZ interaction that regulates the endocytic fate of CFTR, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **51**, 7217–7220 (2012).
56. Zaykov, A. N. & Ball, Z. T. A general synthesis of dirhodium metallopeptides as MDM2 ligands, *Chem. Commun. (Camb.)* **47**, 10927–10929 (2011).
57. Pilsl, L. A. & Reiser, O. α/β -Peptide foldamers: state of the art, *Amino Acids* **41**, 709–718 (2011).
58. Demmer, O. *et al.* A conformationally frozen peptoid boosts CXCR4 affinity and anti-HIV activity, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **51**, 8110–8113 (2012).
59. Yin, H. *et al.* Terphenyl-Based Bak BH3 alpha-helical proteomimetics as low-molecular-weight antagonists of Bcl-xL, *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 10191–10196 (2005).
60. Cabezas, E. & Satterthwait, A. C. The Hydrogen Bond Mimic Approach, *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 3862–3875 (1999).
61. Jochim, A. L. & Arora, P. S. Assessment of helical interfaces in protein-protein interactions, *Mol. Biosyst* **5**, 924–926 (2009).
62. Chapman, R. N. Dimartino, G. & Arora, P. S. A highly stable short alpha-helix constrained by a main-chain hydrogen-bond surrogate, *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 12252–12253 (2004).
63. Henchey, L. K. Porter, J. R. Ghosh, I. & Arora, P. S. High specificity in protein recognition by hydrogen-bond-surrogate α -helices: selective inhibition of the p53/MDM2 complex, *ChemBiochem* **11**, 2104–2107 (2010).

64. Patgiri, A. Yadav, K. K. Arora, P. S. & Bar-Sagi, D. An orthosteric inhibitor of the Ras-Sos interaction, *Nat. Chem. Biol.* **7**, 585–587 (2011).
65. Jackson, D. Y. King, D. S. Chmielewski, J. Singh, S. & Schultz, P. G. General approach to the synthesis of short α -helical peptides, *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 9391–9392 (1991).
66. Bracken, C. Gulyas, J. Taylor, J. W. & Baum, J. Synthesis and Nuclear Magnetic Resonance Structure Determination of an α -Helical, Bicyclic, Lactam-Bridged Hexapeptide, *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 6431–6432 (1994).
67. Galande, A. K. Bramlett, K. S. Burris, T. P. Wittliff, J. L. & Spatola, A. F. Thioether side chain cyclization for helical peptide formation: inhibitors of estrogen receptor-coactivator interactions, *J. Pept. Res.* **63**, 297–302 (2004).
68. Harrison, R. S. *et al.* Downsizing human, bacterial, and viral proteins to short water-stable α helices that maintain biological potency, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 11686–11691 (2010).
69. Kawamoto, S. A. *et al.* Design of triazole-stapled BCL9 α -helical peptides to target the β -catenin/B-cell CLL/lymphoma 9 (BCL9) protein-protein interaction, *J. Med. Chem.* **55**, 1137–1146 (2012).
70. Lau, Y. H. *et al.* Functionalised staple linkages for modulating the cellular activity of stapled peptides, *Chem. Sci.* **5**, 1804 (2014).
71. Muppidi, A. Wang, Z. Li, X. Chen, J. & Lin, Q. Achieving cell penetration with distance-matching cysteine cross-linkers: a facile route to cell-permeable peptide dual inhibitors of Mdm2/Mdmx, *Chem. Commun. (Camb.)* **47**, 9396–9398 (2011).
72. Zhang, F. Timm, K. A. Arndt, K. M. & Woolley, G. A. Photocontrol of coiled-coil proteins in living cells, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **49**, 3943–3946 (2010).
73. Nevola, L. *et al.* Light-regulated stapled peptides to inhibit protein-protein interactions involved in clathrin-mediated endocytosis, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **52**, 7704–7708 (2013).
74. Wang, Y. & Chou, D. H.-C. A Thiol-Ene Coupling Approach to Native Peptide Stapling and Macrocyclization, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **54**, 10931–10934 (2015).
75. Hill, T. A. Shepherd, N. E. Diness, F. & Fairlie, D. P. Constraining cyclic peptides to mimic protein structure motifs, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **53**, 13020–13041 (2014).

76. Blackwell, H. E. & Grubbs, R. H. Highly Efficient Synthesis of Covalently Cross-Linked Peptide Helices by Ring-Closing Metathesis, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **37**, 3281–3284 (1998).
77. Schafmeister, C. E. Po, J. & Verdine, G. L. An All-Hydrocarbon Cross-Linking System for Enhancing the Helicity and Metabolic Stability of Peptides, *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 5891–5892 (2000).
78. Sawyer, T. K. Guerlavais, V. Darlak, K. & Feyfant, E. in *Levin (Ed.) 2015 – Macrocycles in Drug Discovery*, pp. 339–366.
79. Cromm, P. M. Spiegel, J. & Grossmann, T. N. Hydrocarbon Stapled Peptides as Modulators of Biological Function, *ACS Chem. Biol.* **10**, 1362–1375 (2015).
80. Walensky, L. D. & Bird, G. H. Hydrocarbon-Stapled Peptides: Principles, Practice, and Progress, *J. Med. Chem.* **57**, 6275–6288 (2014).
81. Shim, S. Y. Kim, Y.-W. & Verdine, G. L. A new *i, i + 3* peptide stapling system for α -helix stabilization, *Chem. Biol. Drug. Des.* **82**, 635–642 (2013).
82. Kim, Y.-W. Kutchukian, P. S. & Verdine, G. L. Introduction of All-Hydrocarbon *i, i + 3* Staples into α -Helices via Ring-Closing Olefin Metathesis, *Org. Lett.* **12**, 3046–3049 (2010).
83. Kutchukian, P. S. Yang, J. S. Verdine, G. L. & Shakhnovich, E. I. All-atom model for stabilization of alpha-helical structure in peptides by hydrocarbon staples, *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 4622–4627 (2009).
84. Kim, Y.-W. Grossmann, T. N. & Verdine, G. L. Synthesis of all-hydrocarbon stapled α -helical peptides by ring-closing olefin metathesis, *Nat. Protoc.* **6**, 761–771 (2011).
85. Bird, G. H. *et al.* Hydrocarbon double-stapling remedies the proteolytic instability of a lengthy peptide therapeutic, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 14093–14098 (2010).
86. Hilinski, G. J. *et al.* Stitched α -Helical Peptides via Bis Ring-Closing Metathesis, *J. Am. Chem. Soc.* **136**, pp12314-12322 (2014).
87. Walensky, L. D. *et al.* Activation of Apoptosis in Vivo by a Hydrocarbon-Stapled BH3 Helix, *Science* **305**, 1466–1470 (2004).
88. Walensky, L. D. *et al.* A Stapled BID BH3 Helix Directly Binds and Activates BAX, *Mol. Cell. Biol.* **24**, 199–210 (2006).

-
89. Danial, N. N. BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death, *Clin. Cancer Res.* **13**, 7254–7263 (2007).
90. Szlyk, B. *et al.* A phospho-BAD BH3 helix activates glucokinase by a mechanism distinct from that of allosteric activators, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 36–42 (2014).
91. Gavathiotis, E. *et al.* BAX activation is initiated at a novel interaction site, *Nature* **455**, 1076–1081 (2008).
92. Okamoto, T. *et al.* Stabilizing the pro-apoptotic BimBH3 helix (BimSAHB) does not necessarily enhance affinity or biological activity, *ACS Chem. Biol.* **8**, 297–302 (2013).
93. Stewart, M. L. Fire, E. Keating, A. E. & Walensky, L. D. The MCL-1 BH3 helix is an exclusive MCL-1 inhibitor and apoptosis sensitizer, *Nat. Chem. Biol.* **6**, 595–601 (2010).
94. Cohen, N. A. *et al.* A competitive stapled peptide screen identifies a selective small molecule that overcomes MCL-1-dependent leukemia cell survival, *Chem. Biol.* **19**, 1175–1186 (2012).
95. Vassilev, L. T. *et al.* In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2, *Science* **303**, 844–848 (2004).
96. Vu, B. *et al.* Discovery of RG7112: A Small-Molecule MDM2 Inhibitor in Clinical Development, *ACS Med. Chem. Lett.* **4**, 466–469 (2013).
97. Chang, Y. S. *et al.* Stapled α -helical peptide drug development: a potent dual inhibitor of MDM2 and MDMX for p53-dependent cancer therapy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, E3445–54 (2013).
98. Sinclair, J. K.-L. Denton, E. V. & Schepartz, A. Inhibiting Epidermal Growth Factor Receptor at a Distance, *J. Am. Chem. Soc.* **136**, pp 11232–11235 (2014).
99. Moellering, R. E. *et al.* Direct inhibition of the NOTCH transcription factor complex, *Nature* **462**, 182–188 (2009).
100. Grossmann, T. N. *et al.* Inhibition of oncogenic Wnt signaling through direct targeting of β -catenin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 17942–17947 (2012).
101. Kim, W. *et al.* Targeted disruption of the EZH2-EED complex inhibits EZH2-dependent cancer, *Nat. Chem. Biol.* **9**, 643–650 (2013).

102. Zhang, H. *et al.* Antiviral activity of α -helical stapled peptides designed from the HIV-1 capsid dimerization domain, *Retrovirology* **8**, 28 (2011).
103. Zhang, H. *et al.* Dual-acting stapled peptides target both HIV-1 entry and assembly, *Retrovirology* **10**, 136 (2013).
104. Ternois, F. Sticht, J. Duquerroy, S. Kräusslich, H.-G. & Rey, F. A. The HIV-1 capsid protein C-terminal domain in complex with a virus assembly inhibitor, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 678–682 (2005).
105. Bellmann-Sickert, K. Stone, T. A. Poulsen, B. E. & Deber, C. M. Efflux by Small Multidrug Resistance Proteins is Inhibited by Membrane-Interactive Helix-Stapled Peptides, *J. Biol. Chem.* **290**, 1752–1759 (2014).
106. Verdine, G. L. & Hilinski, G. J. All-hydrocarbon stapled peptides as Synthetic Cell-Accessible Mini-Proteins, *Drug Discov. Today Technol.* **9**, e41-e47 (2012).
107. Giordanetto, F. *et al.* Stapled Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) Derivatives Improve VPAC2 Agonism and Glucose-Dependent Insulin Secretion, *ACS Med. Chem. Lett.* **4**, 1163–1168 (2013).
108. Sun, T.-L. Sun, Y. Lee, C.-C. & Huang, H. W. Membrane permeability of hydrocarbon-cross-linked peptides, *Biophys. J.* **104**, 1923–1932 (2013).
109. Chu, Q. *et al.* Towards understanding cell penetration by stapled peptides, *Med. Chem. Commun.* **6**, 111–119 (2015).
110. Bird, G. H. Gavathiotis, E. LaBelle, J. L. Katz, S. G. & Walensky, L. D. Distinct BimBH3 (BimSAHB) Stapled Peptides for Structural and Cellular Studies, *ACS Chem. Biol.* **14**, 140107142548001 (2014).
111. Li, Y.-C. *et al.* A Versatile Platform to Analyze Low-Affinity and Transient Protein-Protein Interactions in Living Cells in Real Time, *Cell Rep.* **9**, 1946–1958 (2014).
112. Xiong Tan, B. *et al.* Assessing the Efficacy of Mdm2/Mdm4-Inhibiting Stapled Peptides Using Cellular Thermal Shift Assays, *Sci Rep* **5**, 12116 (2015).
113. Bechara, C. & Sagan, S. Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand?, *FEBS Lett.* **587**, 1693–1702 (2013).
114. Wennerberg, K. The Ras superfamily at a glance, *J. Cell. Sci.* **118**, 843–846 (2005).

115. Bourne, H. R. Sanders, D. A. & McCormick, F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions, *Nature* **348**, 125–132 (1990).
116. Cherfils, J. & Zeghouf, M. Regulation of Small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs, *Physiol. Rev.* **93**, 269–309 (2013).
117. Vetter, I. R. & Wittinghofer, A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions, *Science* **294**, 1299–1304 (2001).
118. Wittinghofer, A. & Vetter, I. R. Structure-function relationships of the G domain, a canonical switch motif, *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 943–971 (2011).
119. Ahearn, I. M. Haigis, K. Bar-Sagi, D. & Philips, M. R. Regulating the regulator: post-translational modification of RAS, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 39–51 (2012).
120. Gorfe, A. Mechanisms of Allostery and Membrane Attachment in Ras GTPases: Implications for Anti-Cancer Drug Discovery, *CMC* **17**, 1–9 (2010).
121. Vigil, D. Cherfils, J. Rossman, K. L. & Der, C. J. Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy?, *Nat. Rev. Cancer* **10**, 842–857 (2010).
122. Reuther, G. W. & Der, C. J. The Ras branch of small Gtpases: Ras family members don't fall far from the tree, *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 157–165 (2000).
123. Bhui, T. & Roy, J. K. Rab proteins: the key regulators of intracellular vesicle transport, *Exp. Cell Res.* **328**, 1–19 (2014).
124. Donaldson, J. G. & Jackson, C. L. ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 362–375 (2011).
125. Hutagalung, A. H. & Novick, P. J. Role of Rab GTPases in Membrane Traffic and Cell Physiology, *Physiol. Rev.* **91**, 119–149 (2011).
126. Zerial, M. & McBride, H. Rab proteins as membrane organizers, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 107–117 (2001).
127. Hall, A. Rho family GTPases, *Biochem. Soc. Trans.* **40**, 1378–1382 (2012).
128. Etienne-Manneville, S. & Hall, A. Rho GTPases in cell biology, *Nature* **420**, 629–635 (2002).
129. Ridley, A. J. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking, *Trends in Cell Biol.* **16**, 522–529 (2006).

130. Clarke, P. R. & Zhang, C. Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 464–477 (2008).
131. Mitra, S. Cheng, K. W. & Mills, G. B. Rab GTPases implicated in inherited and acquired disorders, *Semin. Cell Dev. Biol.* **22**, 57–68 (2011).
132. Mattingly, R. R. Activated Ras as a Therapeutic Target: Constraints on Directly Targeting Ras Isoforms and Wild-Type versus Mutated Proteins, *ISRN Oncology* **2013**, 1–14 (2013).
133. Vega, F. M. & Ridley, A. J. Rho GTPases in cancer cell biology, *FEBS Lett.* **582**, 2093–2101 (2008).
134. Spiegel, J. Cromm, P. M. Zimmermann, G. Grossmann, T. N. & Waldmann, H. Small-molecule modulation of Ras signaling, *Nat. Chem. Biol.* **10**, 613–622 (2014).
135. Malumbres, M. & Barbacid, M. RAS oncogenes: the first 30 years, *Nat. Rev. Cancer* **3**, 459–465 (2003).
136. Cooper, G. Cellular transforming genes, *Science* **217**, 801–806 (1982).
137. Harvey, J. An Unidentified Virus which causes the Rapid Production of Tumours in Mice, *Nature* **204**, 1104–1105 (1964).
138. Kirsten, W. H. & Mayer, L. A. Morphologic Responses to a Murine Erythroblastosis Virus, *J.Natl. Cancer Inst.* **39**, 311–335 (1967).
139. Shimizu, K. Goldfarb, M. Perucho, M. & Wigler, M. Isolation and preliminary characterization of the transforming gene of a human neuroblastoma cell line, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 383–387 (1983).
140. Schubbert, S. Shannon, K. & Bollag, G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer, *Nat. Rev. Cancer* **7**, 295–308 (2007).
141. Boriack-Sjodin, P. A. Margarit, S. M. Bar-Sagi, D. & Kuriyan, J. The structural basis of the activation of Ras by Sos, *Nature* **394**, 337–343 (1998).
142. Margarit, S. M. *et al.* Structural Evidence for Feedback Activation by Ras-GTP of the Ras-Specific Nucleotide Exchange Factor SOS, *Cell* **112**, 685–695 (2003).
143. Mott, H. R. & Owen, D. Structures of Ras superfamily effector complexes: What have we learnt in two decades?, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **50**, 85–133 (2015).

144. Chung, H. H. Benson, D. R. Cornish, V. W. & Schultz, P. G. Probing the role of loop 2 in Ras function with unnatural amino acids, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 10145–10149 (1993).
145. Ahmadian, M. R. Stege, P. Scheffzek, K. & Wittinghofer, A. Confirmation of the arginine-finger hypothesis for the GAP-stimulated GTP-hydrolysis reaction of Ras, *Nat. Struct. Biol.* **4**, 686–689 (1997).
146. Cox, A. D. Fesik, S. W. Kimmelman, A. C. Luo, J. & Der, C. J. Drugging the undruggable RAS: Mission Possible?, *Nat. Rev. Drug. Discov.* **13**, 828–851 (2014).
147. Prior, I. A. Lewis, P. D. & Mattos, C. A Comprehensive Survey of Ras Mutations in Cancer, *Cancer Res.* **72**, 2457–2467 (2012).
148. Buhrman, G. Holzapfel, G. Fetis, S. & Mattos, C. Allosteric modulation of Ras positions Q61 for a direct role in catalysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 4931–4936 (2010).
149. Scheffzek, K. The Ras-RasGAP Complex: Structural Basis for GTPase Activation and Its Loss in Oncogenic Ras Mutants, *Science* **277**, 333–338 (1997).
150. Schwartz, S. L. Cao, C. Pylypenko, O. Rak, A. & Wandinger-Ness, A. Rab GTPases at a glance, *J. Cell. Sci* **120**, 3905–3910 (2007).
151. Pereira-Leal, J. B. & Seabra, M. C. The mammalian Rab family of small GTPases: definition of family and subfamily sequence motifs suggests a mechanism for functional specificity in the Ras superfamily, *J. Mol. Biol.* **301**, 1077–1087 (2000).
152. Itzen, A. & Goody, R. S. GTPases involved in vesicular trafficking: Structures and mechanisms, *Semin. Cell Dev. Biol.* **22**, 48–56 (2011).
153. Lee, M.-T. G. Mishra, A. & Lambright, D. G. Structural mechanisms for regulation of membrane traffic by rab GTPases, *Traffic* **10**, 1377–1389 (2009).
154. Marat, A. L. Dokainish, H. & McPherson, P. S. DENN domain proteins: regulators of Rab GTPases, *J. Biol. Chem.* **286**, 13791–13800 (2011).
155. Carney, D. S. Davies, B. A. & Horazdovsky, B. F. Vps9 domain-containing proteins: activators of Rab5 GTPases from yeast to neurons, *Trends in Cell Biol.* **16**, 27–35 (2006).
156. Guo, Z. Hou, X. Goody, R. S. & Itzen, A. Intermediates in the Guanine Nucleotide Exchange Reaction of Rab8 Protein Catalyzed by Guanine Nucleotide Exchange Factors Rabin8 and GRAB, *J. Biol. Chem.* **288**, 32466–32474 (2013).

157. Schmick, M. *et al.* KRas localizes to the plasma membrane by spatial cycles of solubilization, trapping and vesicular transport, *Cell* **157**, 459–471 (2014).
158. Fukuda, M. Kanno, E. Ishibashi, K. & Itoh, T. Large Scale Screening for Novel Rab Effectors Reveals Unexpected Broad Rab Binding Specificity, *Mol. Cell Proteomics* **7**, 1031–1042 (2008).
159. Kanno, E. *et al.* Comprehensive screening for novel rab-binding proteins by GST pull-down assay using 60 different mammalian Rabs, *Traffic* **11**, 491–507 (2010).
160. Christoforidis, S. McBride, H. M. Burgoyne, R. D. & Zerial, M. The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking, *Nature* **397**, 621–625 (1999).
161. Khan, A. R. & Ménétrey, J. Structural Biology of Arf and Rab GTPases' Effector Recruitment and Specificity, *Structure* **21**, 1284–1297 (2013).
162. Bergbrede, T. *et al.* Biophysical Analysis of the Interaction of Rab6a GTPase with Its Effector Domains, *J. Biol. Chem.* **284**, 2628–2635 (2008).
163. Simon, I. Zerial, M. & Goody, R. S. Kinetics of Interaction of Rab5 and Rab7 with Nucleotides and Magnesium Ions, *J. Biol. Chem.* **271**, 20470–20478 (1996).
164. Frasa, Marieke A. M. Koessmeier, K. T. Ahmadian, M. R. & Braga, Vania M. M. Illuminating the functional and structural repertoire of human TBC/RABGAPs, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2012).
165. Pan, X. Eathiraj, S. Munson, M. & Lambright, D. G. TBC-domain GAPs for Rab GTPases accelerate GTP hydrolysis by a dual-finger mechanism, *Nature* **442**, 303–306 (2006).
166. Agola, J. O. Jim, P. A. Ward, H. H. Basuray, S. & Wandinger-Ness, A. Rab GTPases as regulators of endocytosis, targets of disease and therapeutic opportunities, *Clin. Genet.* **80**, 305–318 (2011).
167. Spinosa, M. R. *et al.* Functional characterization of Rab7 mutant proteins associated with Charcot-Marie-Tooth type 2B disease, *J. Neurosci.* **28**, 1640–1648 (2008).
168. Mitra, S. Cheng, K. W. & Mills, G. B. Rab25 in cancer: a brief update, *Biochem. Soc. Trans.* **40**, 1404–1408 (2012).
169. Bravo-Cordero, J. J. *et al.* MT1-MMP proinvasive activity is regulated by a novel Rab8-dependent exocytic pathway, *EMBO J.* **26**, 1499–1510 (2007).

170. Ang, A. L. Fölsch, H. Koivisto, U.-M. Pypaert, M. & Mellman, I. The Rab8 GTPase selectively regulates AP-1B-dependent basolateral transport in polarized Madin-Darby canine kidney cells, *J. Cell. Biol.* **163**, 339–350 (2003).
171. Shen, D.-W. & Gottesman, M. M. RAB8 enhances TMEM205-mediated cisplatin resistance, *Pharm. Res.* **29**, 643–650 (2012).
172. Becher, I. *et al.* Affinity profiling of the cellular kinome for the nucleotide cofactors ATP, ADP, and GTP, *ACS Chem. Biol.* **8**, 599–607 (2013).
173. John, J. *et al.* Kinetic and structural analysis of the Mg(2+)-binding site of the guanine nucleotide-binding protein p21H-ras, *J. Biol. Chem.* **268**, 923–929 (1993).
174. Hoffenberg, S. *et al.* Specific and effective interaction of a guanine nucleotide analogue with small G proteins, *Mol. Pharmacol.* **49**, 156–164 (1996).
175. Wolin, R. *et al.* Synthesis and evaluation of pyrazolo[3,4-b]quinoline ribofuranosides and their derivatives as inhibitors of oncogenic Ras, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **6**, 195–200 (1996).
176. Agola, J. O. *et al.* A competitive nucleotide binding inhibitor: in vitro characterization of Rab7 GTPase inhibition, *ACS Chem. Biol.* **7**, 1095–1108 (2012).
177. Hong, L. *et al.* A Pan-GTPase Inhibitor as a Molecular Probe, *PLoS ONE* **10**, e0134317 (2015).
178. Wang, W. Fang, G. & Rudolph, J. Ras inhibition via direct Ras binding—is there a path forward?, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 5766–5776 (2012).
179. Berndt, N. Hamilton, A. D. & Sebti, S. M. Targeting protein prenylation for cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer* **11**, 775–791 (2011).
180. Blumenschein, G. *et al.* O-082 A randomized phase III trial comparing ionafarnib/carboplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel (CP) in chemotherapy-naive patients with advanced or metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC), *Lung Cancer* **49**, Supplement 2, S30 (2005).
181. van Cutsem, E. *et al.* Phase III trial of gemcitabine plus tipifarnib compared with gemcitabine plus placebo in advanced pancreatic cancer, *J. Clin. Oncol.* **22**, 1430–1438 (2004).
182. Whyte, D. B. K- and N-Ras Are Geranylgeranylated in Cells Treated with Farnesyl Protein Transferase Inhibitors, *J. Biol. Chem.* **272**, 14459–14464 (1997).

183. Wang, Y. Kaiser, C. E. Frett, B. & Li, H.-y. Targeting Mutant KRAS for Anticancer Therapeutics: A Review of Novel Small Molecule Modulators, *J. Med. Chem.* **56**, 5219–5230 (2013).
184. Prahallad, A. *et al.* Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR, *Nature* **483**, 100–103 (2012).
185. Turke, A. B. *et al.* MEK inhibition leads to PI3K/AKT activation by relieving a negative feedback on ERBB receptors, *Cancer Res.* **72**, 3228–3237 (2012).
186. Zhang, C. *et al.* RAF inhibitors that evade paradoxical MAPK pathway activation, *Nature* **526**, 583–586 (2015).
187. Barnard, D. Sun, H. Baker, L. & Marshall, M. S. In Vitro Inhibition of Ras–Raf Association by Short Peptides, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**, 176–180 (1998).
188. Wu, X. Upadhyaya, P. Villalona-Calero, M. A. Briesewitz, R. & Pei, D. Inhibition of Ras–effector interactions by cyclic peptides, *Med. Chem. Commun.* **4**, 378 (2013).
189. Sacco, E. *et al.* Binding properties and biological characterization of new sugar-derived Ras ligands, *Med. Chem. Commun.* **2**, 396 (2011).
190. Schöpel, M. *et al.* Bisphenol A Binds to Ras Proteins and Competes with Guanine Nucleotide Exchange: Implications for GTPase-Selective Antagonists, *J. Med. Chem.* **56**, 9664–9672 (2013).
191. Sun, Q. *et al.* Discovery of Small Molecules that Bind to K-Ras and Inhibit Sos-Mediated Activation, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **51**, 6140–6143 (2012).
192. Maurer, T. *et al.* Small-molecule ligands bind to a distinct pocket in Ras and inhibit SOS-mediated nucleotide exchange activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 5299–5304 (2012).
193. Hocker, H. J. *et al.* Andrographolide derivatives inhibit guanine nucleotide exchange and abrogate oncogenic Ras function, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 10201–10206 (2013).
194. Yan, C. *et al.* Discovery and characterization of small molecules that target the GTPase Ral, *Nature* (2014).
195. Bidaud-Meynard, A. *et al.* A novel small-molecule screening strategy identifies mitoxantrone as a RhoGTPase inhibitor, *Biochem. J.* **450**, 55–62 (2013).

196. Deng, J. *et al.* Design and synthesis of small molecule RhoA inhibitors: a new promising therapy for cardiovascular diseases?, *J. Med. Chem.* **54**, 4508–4522 (2011).
197. Ma, S. *et al.* Development of Second-Generation Small-Molecule RhoA Inhibitors with Enhanced Water Solubility, Tissue Potency, and Significant *in vivo* Efficacy, *Chem. Med. Chem.* **10**, 193–206 (2015).
198. Zins, K. Gunawardhana, S. Lucas, T. Abraham, D. & Aharinejad, S. Targeting Cdc42 with the small molecule drug AZA197 suppresses primary colon cancer growth and prolongs survival in a preclinical mouse xenograft model by downregulation of PAK1 activity, *J. Transl. Med.* **11**, 295 (2013).
199. Ostrem, J. M. Peters, U. Sos, M. L. Wells, J. A. & Shokat, K. M. K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions, *Nature* **503**, 548–551 (2013).
200. Wang, X. Hu, B. Zimmermann, B. & Kilimann, M. W. Rim1 and Rabphilin-3 Bind Rab3-GTP by Composite Determinants Partially Related through N-terminal α -Helix Motifs, *J. Biol. Chem.* **276**, 32480–32488 (2001).
201. Renault, L. Guibert, B. & Cherfils, J. Structural snapshots of the mechanism and inhibition of a guanine nucleotide exchange factor, *Nature* **426**, 525–530 (2003).
202. Mossessova, E. Corpina, R. A. & Goldberg, J. Crystal Structure of ARF1•Sec7 Complexed with Brefeldin A and Its Implications for the Guanine Nucleotide Exchange Mechanism, *Mol. Cell* **12**, 1403–1411 (2003).
203. Viaud, J. *et al.* Structure-based discovery of an inhibitor of Arf activation by Sec7 domains through targeting of protein-protein complexes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 10370–10375 (2007).
204. Winter, J. *et al.* Small molecule binding sites on the Ras:SOS complex can be exploited for inhibition of Ras activation, *J. Med. Chem.* **58**, 2265–2274 (2015).
205. Patgiri, A. Jochim, A. L. & Arora, P. S. A Hydrogen Bond Surrogate Approach for Stabilization of Short Peptide Sequences in α -Helical Conformation, *Acc. Chem. Res.* **41**, 1289–1300 (2008).
206. Young, A. Lou, D. & McCormick, F. Oncogenic and Wild-type Ras Play Divergent Roles in the Regulation of Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling, *Cancer Discov.* **3**, 112–123 (2013).

207. Anastassiadis, T. & Brown, E. J. Wild-type RAS: keeping mutant RAS in CHK, *Cancer Cell* **25**, 137–138 (2014).
208. Grabocka, E. *et al.* Wild-type H- and N-Ras promote mutant K-Ras-driven tumorigenesis by modulating the DNA damage response, *Cancer Cell* **25**, 243–256 (2014).
209. Tanaka, T. Williams, R. L. & Rabbitts, T. H. Tumour prevention by a single antibody domain targeting the interaction of signal transduction proteins with RAS, *EMBO J.* **26**, 3250–3259 (2007).
210. Tanaka, T. & Rabbitts, T. H. Interfering with RAS–effector protein interactions prevent RAS-dependent tumour initiation and causes stop–start control of cancer growth, *Oncogene* **29**, 6064–6070 (2010).
211. Waldmann, H. *et al.* Sulindac-Derived Ras Pathway Inhibitors Target the Ras–Raf Interaction and Downstream Effectors in the Ras Pathway, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **43**, 454–458 (2004).
212. Lu, Y. *et al.* Solution phase parallel synthesis and evaluation of MAPK inhibitory activities of close structural analogues of a Ras pathway modulator, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 3957–3962 (2004).
213. Shima, F. *et al.* In silico discovery of small-molecule Ras inhibitors that display antitumor activity by blocking the Ras-effector interaction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 8182–8187 (2013).
214. Rosnizeck, I. C. *et al.* Stabilizing a Weak Binding State for Effectors in the Human Ras Protein by Cyclen Complexes, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **49**, 3830–3833 (2010).
215. Spoerner, M. Graf, T. König, B. & Kalbitzer, H. R. A novel mechanism for the modulation of the Ras-effector interaction by small molecules, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **334**, 709–713 (2005).
216. Rosnizeck, I. C. *et al.* Metal–Bis(2-picolyl)amine Complexes as State 1(T) Inhibitors of Activated Ras Protein, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **51**, 10647–10651 (2012).
217. Gail, R. Costisella, B. Ahmadian, M. R. & Wittinghofer, A. Ras-Mediated Cleavage of a GTP Analogue by a Novel Mechanism, *ChemBioChem* **2**, 570–575 (2001).

218. Ahmadian, M. R. *et al.* Guanosine triphosphatase stimulation of oncogenic Ras mutants, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 7065–7070 (1999).
219. Grewal, T. Koese, M. Tebar, F. & Enrich, C. Differential Regulation of RasGAPs in Cancer, *Genes Cancer* **2**, 288–297 (2011).
220. Baines, A. T. Xu, D. & Der, C. J. Inhibition of Ras for cancer treatment: the search continues, *Fut. Med. Chem.* **3**, 1787–1808 (2011).
221. Gareiss, P. C. Schneekloth, A. R. Salcius, M. J. Seo, S.-Y. & Crews, C. M. Identification and Characterization of a Peptidic Ligand for Ras, *ChemBioChem* **11**, 517–522 (2010).
222. Nájera, C. & Sansano, J. M. Catalytic Asymmetric Synthesis of α -Amino Acids, *Chem. Rev.* **107**, 4584–4671 (2007).
223. Aceña, J. L. Sorochinsky, A. E. & Soloshonok, V. Asymmetric synthesis of α -amino acids via homologation of Ni(II) complexes of glycine Schiff bases. Part 3: Michael addition reactions and miscellaneous transformations, *Amino Acids* **46**, 2047–2073 (2014).
224. Sorochinsky, A. Aceña, J. Moriwaki, H. Sato, T. & Soloshonok, V. Asymmetric synthesis of α -amino acids via homologation of Ni(II) complexes of glycine Schiff bases; Part 1: alkyl halide alkylations, *Amino Acids* **45**, 691–718 (2013).
225. Sorochinsky, A. Aceña, J. Moriwaki, H. Sato, T. & Soloshonok, V. Asymmetric synthesis of α -amino acids via homologation of Ni(II) complexes of glycine Schiff bases. Part 2: Aldol, Mannich addition reactions, deracemization and (S) to (R) interconversion of α -amino acids, *Amino Acids* **45**, 1017–1033 (2013).
226. Belokon', Y. N. Tararov, V. I. Maleev, V. I. Savel'eva, T. F. & Ryzhov, M. G. Improved procedures for the synthesis of (S)-2-[N-(N'-benzylpropyl)amino]benzophenone (BPB) and Ni(II) complexes of Schiff's bases derived from BPB and amino acids, *Tetrahedron: Asymmetry* **9**, 4249–4252 (1998).
227. Ueki, H. *et al.* Improved Synthesis of Proline-Derived Ni(II) Complexes of Glycine: Versatile Chiral Equivalents of Nucleophilic Glycine for General Asymmetric Synthesis of α -Amino Acids, *J. Org. Chem.* **68**, 7104–7107 (2003).

228. El-Faham, A. Subirós Funosas, R. Prohens, R. & Albericio, F. COMU: a safer and more effective replacement for benzotriazole-based uronium coupling reagents, *Chemistry* **15**, 9404–9416 (2009).
229. Scheffzek, K. *et al.* The Ras-Byr2RBD Complex, *Structure* **9**, 1043–1050.
230. Fetis, S. K. *et al.* Allosteric effects of the oncogenic RasQ61L mutant on Raf-RBD, *Structure* **23**, 505–516 (2015).
231. Filchtinski, D. *et al.* What makes Ras an efficient molecular switch: a computational, biophysical, and structural study of Ras-GDP interactions with mutants of Raf, *J. Mol. Biol.* **399**, 422–435 (2010).
232. Nassar, N. *et al.* The 2.2 Å crystal structure of the Ras-binding domain of the serine/threonine kinase c-Raf1 in complex with Rap1A and a GTP analogue, *Nature* **375**, 554–560 (1995).
233. Nassar, N. *et al.* Ras/Rap effector specificity determined by charge reversal, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **3**, 723–729 (1996).
234. Qamra, R. & Hubbard, S. R. Structural basis for the interaction of the adaptor protein grb14 with activated ras, *PLoS ONE* **8**, e72473 (2013).
235. Pacold, M. E. *et al.* Crystal Structure and Functional Analysis of Ras Binding to Its Effector Phosphoinositide 3-Kinase γ , *Cell* **103**, 931–944 (2000).
236. Bunney, T. D. *et al.* Structural and mechanistic insights into ras association domains of phospholipase C epsilon, *Mol. Cell* **21**, 495–507 (2006).
237. Huang, L. Weng, X. Hofer, F. Martin, G. S. & Kirn, S.-H. Three-dimensional structure of the Ras-interacting domain of RalGDS, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **4**, 609–615 (1997).
238. Stieglitz, B. *et al.* Novel type of Ras effector interaction established between tumour suppressor NORE1A and Ras switch II, *EMBO J.* **27**, 1995–2005 (2008).
239. Smith, M. J. & Ikura, M. Integrated RAS signaling defined by parallel NMR detection of effectors and regulators, *Nat. Chem. Biol.* **10**, 223–230 (2014).
240. Wohlgemuth, S. *et al.* Recognizing and defining true Ras binding domains I: biochemical analysis, *J. Mol. Biol.* **348**, 741–758 (2005).

241. Block, C. Janknecht, R. Herrmann, C. Nassar, N. & Wittinghofer, A. Quantitative structure-activity analysis correlating Ras/Raf interaction in vitro to Raf activation in vivo, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **3**, 244–251 (1996).
242. Thakkar, A. Trinh, T. B. & Pei, D. Global Analysis of Peptide Cyclization Efficiency, *ACS Comb. Sci.* **15**, 120–129 (2012).
243. El-Faham, A. & Albericio, F. Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup, *Chem. Rev.* **111**, 6557–6602 (2011).
244. White, C. J. & Yudin, A. K. Contemporary strategies for peptide macrocyclization, *Nat Chem* **3**, 509–524 (2011).
245. Chen, L. Annis, I. & Barany, G. Disulfide bond formation in peptides, *Curr. Protoc. Protein Sci.* **18**, Unit18.6 (2001).
246. Postma, T. M. & Albericio, F. N-Chlorosuccinimide, an efficient reagent for on-resin disulfide formation in solid-phase peptide synthesis, *Org. Lett.* **15**, 616–619 (2013).
247. John, J. *et al.* Kinetics of interaction of nucleotides with nucleotide-free H-ras p21, *Biochemistry* **29**, 6058–6065 (1990).
248. Upadhyaya, P. Qian, Z. Habir, Nurlaila A A & Pei, D. Direct Ras Inhibitors Identified from a Structurally Rigidified Bicyclic Peptide Library, *Tetrahedron* **70**, 7714–7720 (2014).
249. Upadhyaya, P. *et al.* Inhibition of Ras Signaling by Blocking Ras-Effector Interactions with Cyclic Peptides, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* DOI: 10.1002/anie.201502763 (2015).
250. Berman, H. M. *et al.* The Protein Data Bank, *Nucleic Acids Res.* **28**, 235–242 (2000).
251. Sanner, M. F. Olson, A. J. & Spehner, J.-C. Reduced surface: An efficient way to compute molecular surfaces, *Biopolymers* **38**, 305–320 (1996).
252. Sacco, E. *et al.* Novel RasGRF1-derived Tat-fused peptides inhibiting Ras-dependent proliferation and migration in mouse and human cancer cells, *Biotech. Adv.* **30**, 233–243 (2012).
253. Leshchiner, E. S. *et al.* Direct inhibition of oncogenic KRAS by hydrocarbon-stapled SOS1 helices, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2015).

254. Sondermann, H. *et al.* Structural analysis of autoinhibition in the Ras activator Son of sevenless, *Cell* **119**, 393–405 (2004).
255. Raaijmakers, J. H. & Bos, J. L. Specificity in Ras and Rap signaling, *J. Biol. Chem.* **284**, 10995–10999 (2009).
256. Bernardis, A. GAPs galore!, *Biochim. Biophys. Acta* **1603**, 47–82 (2003).
257. Scrima, A. Thomas, C. Deaconescu, D. & Wittinghofer, A. The Rap-RapGAP complex: GTP hydrolysis without catalytic glutamine and arginine residues, *EMBO J.* **27**, 1145–1153 (2008).
258. Tickler, A. K. & Wade, J. D. Overview of solid phase synthesis of "difficult peptide" sequences, *Curr. Protoc. Protein Sci.* **18**, Unit 18.8 (2007).
259. Recacha, R. *et al.* Structural Basis for Recruitment of Rab6-Interacting Protein 1 to Golgi via a RUN Domain, *Structure* **17**, 21–30 (2009).
260. Schoebel, S. Cichy, A. L. Goody, R. S. & Itzen, A. Protein LidA from Legionella is a Rab GTPase supereffector, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2011).
261. Zhu, G. *et al.* Structural basis of Rab5-Rabaptin5 interaction in endocytosis, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 975–983 (2004).
262. Burguete, A. S. Fenn, T. D. Brunger, A. T. & Pfeffer, S. R. Rab and Arl GTPase Family Members Cooperate in the Localization of the Golgin GCC185, *Cell* **132**, 286–298 (2008).
263. Rak, A. *et al.* Structure of the Rab7:REP-1 Complex Insights into the Mechanism of Rab Prenylation and Choroideremia Disease, *Cell* **117**, 749–760 (2004).
264. Jagoe, W. N. *et al.* Crystal Structure of Rab11 in Complex with Rab11 Family Interacting Protein 2, *Structure* **14**, 1273–1283 (2006).
265. Eathiraj, S. Mishra, A. Prekeris, R. & Lambright, D. G. Structural Basis for Rab11-mediated Recruitment of FIP3 to Recycling Endosomes, *J. Mol. Biol.* **364**, 121–135 (2006).
266. Sato, Y. Fukai, S. Ishitani, R. & Nureki, O. Crystal structure of the Sec4p-Sec2p complex in the nucleotide exchanging intermediate state, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 8305–8310 (2007).

267. Ignatev, A. Kravchenko, S. Rak, A. Goody, R. S. & Pylypenko, O. A Structural Model of the GDP Dissociation Inhibitor Rab Membrane Extraction Mechanism, *J. Biol. Chem.* **283**, 18377–18384 (2008).
268. Schoebel, S. Oesterlin, L. K. Blankenfeldt, W. Goody, R. S. & Itzen, A. RabGDI Displacement by DrrA from Legionella Is a Consequence of Its Guanine Nucleotide Exchange Activity, *Mol. Cell. Biol.* **36**, 1060–1072 (2009).
269. Cai, Y. *et al.* The Structural Basis for Activation of the Rab Ypt1p by the TRAPP Membrane-Tethering Complexes, *Cell* **133**, 1202–1213 (2008).
270. Mishra, A. Eathiraj, S. Corvera, S. & Lambright, D. G. Structural basis for Rab GTPase recognition and endosome tethering by the C2H2 zinc finger of Early Endosomal Autoantigen 1 (EEA1), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 10866–10871 (2010).
271. Ostermeier, C. & Brunger, A. T. Structural Basis of Rab Effector Specificity: Crystal Structure of the Small G Protein Rab3A Complexed with the Effector Domain of Rabphilin-3A, *Cell* **96**, 363–374 (1999).
272. Eathiraj, S. Pan, X. Ritacco, C. & Lambright, D. G. Structural basis of family-wide Rab GTPase recognition by rabenosyn-5, *Nature* **436**, 415–419 (2005).
273. Chavas, L. M. *et al.* Elucidation of Rab27 Recruitment by Its Effectors: Structure of Rab27a Bound to Exophilin4/Slp2-a, *Structure* **16**, 1468–1477 (2008).
274. McKiernan, C. J. Stabila, P. F. & Macara, I. G. Role of the Rab3A-binding domain in targeting of rabphilin-3A to vesicle membranes of PC12 cells, *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4985–4995 (1996).
275. Esters, H. *et al.* Vps9, Rabex-5 and DSS4: proteins with weak but distinct nucleotide-exchange activities for Rab proteins, *J. Mol. Biol.* **310**, 141–156 (2001).
276. Blumer, J. *et al.* RabGEFs are a major determinant for specific Rab membrane targeting, *J. Cell. Biol.* **200**, 287–300 (2013).
277. Bergbrede, T. Pylypenko, O. Rak, A. & Alexandrov, K. Structure of the extremely slow GTPase Rab6A in the GTP bound form at 1.8 Å resolution, *J. Struct. Biol.* **152**, 235–238 (2005).
278. Zhang, J. & Matthews, C. R. Ligand binding is the principal determinant of stability for the p21(H)-ras protein, *Biochemistry* **37**, 14881–14890 (1998).

279. Spiegel, J. *et al.* Direkte Modulation von Rab-GTPase-Effektor-Wechselwirkungen, *Angew. Chem.* **126**, 2531–2536 (2014).
280. Hou, X. *et al.* A structural basis for Lowe syndrome caused by mutations in the Rab-binding domain of OCRL1, *EMBO J.* **30**, 1659–1670 (2011).
281. Lacroix, E. Viguera, A. R. & Serrano, L. Elucidating the folding problem of alpha-helices: local motifs, long-range electrostatics, ionic-strength dependence and prediction of NMR parameters, *J. Mol. Biol.* **284**, 173–191 (1998).
282. Delprato, A. Merithew, E. & Lambright, D. G. Structure, Exchange Determinants, and Family-Wide Rab Specificity of the Tandem Helical Bundle and Vps9 Domains of Rabex-5, *Cell* **118**, 607–617 (2004).
283. Leonard, D. A. Evans, T. Hart, M. Cerione, R. A. & Manor, D. Investigation of the GTP-Binding/GTPase Cycle of Cdc42Hs Using Fluorescence Spectroscopy, *Biochemistry* **33**, 12323–12328 (1994).
284. Knodler, A. *et al.* Coordination of Rab8 and Rab11 in primary ciliogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 6346–6351 (2010).
285. Feng, S. *et al.* A Rab8 Guanine Nucleotide Exchange Factor-Effector Interaction Network Regulates Primary Ciliogenesis, *J. Biol. Chem.* **287**, 15602–15609 (2012).
286. Lenzen, C. Cool, R. H. Prinz, H. Kuhlmann, J. & Wittinghofer, A. Kinetic Analysis by Fluorescence of the Interaction between Ras and the Catalytic Domain of the Guanine Nucleotide Exchange Factor Cdc25 Mm, *Biochemistry* **37**, 7420–7430 (1998).
287. Attree, O. *et al.* The Lowe's oculocerebrorenal syndrome gene encodes a protein highly homologous to inositol polyphosphate-5-phosphatase, *Nature* **358**, 239–242 (1992).
288. Swan, L. E. Tomasini, L. Pirruccello, M. Lunardi, J. & Camilli, P. de. Two closely related endocytic proteins that share a common OCRL-binding motif with APPL1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 3511–3516 (2010).
289. INNOVAGEN. Peptide property calculator. Available at <http://pepcalc.com/>.
290. Grigoryev, Y. Stapled peptide to enter human testing, but affinity questions remain, *Nat. Med.* **19**, 120 (2013).
291. Guerlavais, V. & Sawyer, T. K. (Elsevier2014), pp. 331–345.

292. Hansen, M. Kilk, K. & Langel, U. Predicting cell-penetrating peptides, *Adv. Drug Deliv. Rev* **60**, 572–579 (2008).
293. Grigoriev, I. *et al.* Rab6, Rab8, and MICAL3 cooperate in controlling docking and fusion of exocytotic carriers, *Curr. Biol.* **21**, 967–974 (2011).
294. Spiegel, J. *et al.* Direct Targeting of Rab-GTPase-Effector Interactions, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **53**, 2498–2503 (2014).
295. LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature* **227**, 680–685 (1970).
296. Chen, Y.-X. *et al.* Synthesis of the Rheb and K-Ras4B GTPases, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **49**, 6090–6095 (2010).
297. Berrow, N. S. *et al.* A versatile ligation-independent cloning method suitable for high-throughput expression screening applications, *Nucleic Acids Res.* **35**, e45 (2007).
298. Motulsky, H. & Christopoulos, A. *Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. A practical guide to curve fitting* (Oxford University Press, Oxford, New York, 2004).
299. Huang, X. & Aulabaugh, A. Application of fluorescence polarization in HTS assays, *Methods Mol. Biol.* **565**, 127–143 (2009).
300. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. A one-letter notation for amino acid sequences. Tentative rules, *Biochem. J.* **113**, 1–4 (1969).

10Anhang

Tabelle 5. Ergebnisse der FP-Bindungsexperimente der von der Ras-GEFs abgeleiteten Peptide(N = 1). K_D -Werte sind in μM angegeben.

Peptid	H-Ras (NF)	H-Ras (GDP)	H-Ras (GppNHp)
32	>300	>300	>300
33	>300	>300	>300
34	>300	>300	>300

Tabelle 6. Ergebnisse der FP-Bindungsexperimente der von der SOS αH -Helix abgeleiteten Derivate mit den verschiedenen Ras-Isoformen in den drei Nukleotidbindungszuständen (N = 1). K_D -Werte sind in μM angegeben.

Peptid	Protein							
	H-Ras (NF)	H-Ras (GDP)	H-Ras (GppNHp)	N-Ras (NF)	N-Ras (GppNHp)	N-Ras (GDP)	K-Ras (GDP)	K-Ras (GppNHp)
32	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
35	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
36	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
37	>300	>300	>300	>300	>300	>300	n.b.	n.b.
38	>300	>300	>300	>300	>300	>300	n.b.	n.b.
33	>300	>300	>300	>300	>300	>300	n.b.	n.b.
39	>300	>300	>300	>300	>300	>300	n.b.	n.b.
40	>300	>300	>300	>300	>300	>300	n.b.	n.b.
41	>300	>300	>300	>300	>300	>300	n.b.	n.b.
42	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300

Tabelle 7. Ergebnisse der FP-Bindungsexperimente GPD-gebundener Rab-Proteine mit Wildtyp-Peptidsequenzen (N = 1). K_D -Werte sind in μM angegeben.

Peptid	Protein						
	Rab1b (GDP)	Rab5a (GDP)	Rab6a (GDP)	Rab7a (GDP)	Rab8a (GDP)	Rab9a (GDP)	Rab11a (GDP)
66a	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
67a	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
68a	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
69a	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
70a	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
71a	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
72a	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
73a	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
74a	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
75a	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
76a	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300

Tabelle 8. Ergebnisse der FP-Bindungsexperimente GppNHp-gebundener Rab-Proteine mit Wildtyp-Peptidsequenzen (N = 1). K_D -Werte sind in μM angegeben.

Peptid	Protein						
	Rab1b (GppNHp)	Rab5a (GppNHp)	Rab6a (GppNHp)	Rab7a (GppNHp)	Rab8a (GppNHp)	Rab9a (GppNHp)	Rab11a (GppNHp)
66a	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
67a	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
68a	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
69a	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
70a	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
71a	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
72a	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
73a	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
74a	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
75a	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
76a	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300

Tabelle 9. Ergebnisse der FP-Bindungsexperimente nukleotidfreier Rab-Proteinen mit Wildtyp-Peptidsequenzen (N = 1). K_D -Werte sind in μM angegeben.

Peptid	Protein						
	Rab1b (NF)	Rab5a (NF)	Rab6a (NF)	Rab7a (NF)	Rab8a (NF)	Rab9a (NF)	Rab11a (NF)
66a	40	10	20	120	5	30	40
67a	>300	>300	110	>300	160	>300	>300
68a	38	40	60	>300	30	20	>300
69a	>300	>300	110	>300	>300	>300	>300
70a	>300	150	>300	>300	>300	>300	>300
71a	>300	>300	120	>300	>300	>300	>300
72a	>300	>300	120	>300	170	>300	>300
73a	>300	40	60	>300	20	210	>300
74a	170	10	8	50	50	20	>300
75a							
76a							

Tabelle 10. Ergebnisse der FP-Bindungsexperimente α -methylierter, kohlenwasserstoffverbrückter Peptide mit Rab-Proteinen in verschiedenen Nukleotidbindungszuständen (N = 3; Fehler repräsentieren 1 σ). K_D -Werte sind in μM angegeben.

Peptide	Protein																	
	Rab1			Rab5			Rab6			Rab8			Rab9			Rab11		
	GDP	NF	GppNHp	GDP	GppNHp	NF	GDP	GppNHp	NF	GDP	GppNHp	NF	GDP	GppNHp	NF	GDP	GppNHp	NF
66a	>100	25	>100	>100	>100	19.2 \pm 0.4	>100	>100	3.0 \pm 0.2	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	7.3 \pm 6.7
77a	>100	1.5 \pm 0.1	>100	>100	>100	2.6 \pm 0.1	>100	>100	0.56 \pm 0.03	>100	>100	47	>100	>100	35	>100	>100	1.5 \pm 0.1
78a	>100	16.9 \pm 0.5	>100	>100	>100	5.4 \pm 0.2	>100	>100	1.2 \pm 0.1	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	5.5 \pm 0.4
79a	>100	33	>100	>100	>100	1.8 \pm 0.1	>100	>100	0.40 \pm 0.02	>100	>100	22.2 \pm 1.2	>100	>100	21	>100	>100	0.81 \pm 0.05
80a	>100	4.2 \pm 0.2	>100	>100	>100	9.6 \pm 0.3	>100	>100	3.0 \pm 0.1	>100	>100	>100	>100	>100	42	>100	>100	3.4 \pm 0.2
68a	>100	90	>100	>100	>100	90 \pm 5	>100	>100	40 \pm 1	>100	>100	>100	>100	>100	95	>100	>100	>100
81a	>100	3.8 \pm 0.3	>100	>100	>100	4.2 \pm 0.3	>100	>100	2.0 \pm 0.1	>100	>100	>100	>100	>100	12.3 \pm 0.4	>100	>100	28.1 \pm 2.6
82a	>100	50	>100	>100	>100	65 \pm 5	>100	>100	20	>100	>100	>100	>100	>100	90	>100	>100	>100
83a	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	75	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
74a	>100	45	>100	>100	>100	7.3 \pm 0.8	>100	>100	8.6 \pm 0.7	>100	>100	>100	>100	>100	98	>100	>100	>100
84a	>100	1.1 \pm 0.1	>100	>100	>100	1.0 \pm 0.1	>100	>100	0.96 \pm 0.05	>100	>100	91	>100	>100	14.8 \pm 0.8	>100	>100	0.51 \pm 0.04
85a	>100	1.6 \pm 0.1	>100	>100	>100	1.6 \pm 0.1	>100	>100	1.2 \pm 0.1	>100	>100	83	>100	>100	12.1 \pm 0.9	>100	>100	0.42 \pm 0.03
73a	>100	>100	>100	>100	>100	50 \pm 1	>100	>100	6.1 \pm 0.4	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
86a	>100	2.1 \pm 0.8	>100	>100	>100	3.0 \pm 0.2	>100	>100	0.79 \pm 0.03	>100	>100	78	>100	>100	16.2 \pm 1.7	>100	>100	1.4 \pm 0.1
87a	>100	2.3 \pm 0.1	>100	>100	>100	2.2 \pm 0.1	>100	>100	0.76 \pm 0.03	>100	>100	56	>100	>100	15.3 \pm 1.6	>100	>100	0.52 \pm 0.06
88a	>100	9.2 \pm 0.2	>100	>100	>100	8.3 \pm 0.3	>100	>100	1.5 \pm 0.1	>100	>100	>100	>100	>100	68	>100	>100	57
89a	>100	1.9 \pm 0.1	>100	>100	>100	2.2 \pm 0.1	>100	>100	0.75 \pm 0.03	>100	>100	75	>100	>100	18.9 \pm 2.3	>100	>100	1.1 \pm 0.1

Tabelle 11. Ergebnisse der FP-Bindungsexperimente der von **79** abgeleiteten Derivate (N = 1). K_D -Werte sind in μM angegeben.

Peptid	Sequenz	K_D [Rab8(GppNHp)]	rel. K_D
66	DDEKEQFLYHLLSFNAV	80 ^[a]	6.9
90	XDDGKEQFLYHLLSFNAV	47 ^[a]	5.1
91	DDE-S ₄ -EQF-S ₅ -YHLLSFNAV	18.6 ^[a]	2.0
92	DDE-S ₆ -EQF-S ₅ -YHLLSFNAV	10.8 ^[a]	1.2
93	DDE-S ₆ -EQF-S ₆ -YHLLSFNAV	7.3 ^[a]	0.8
94	DDE-S ₅ -EQF-S ₅ -YHLLSFNAV	11.5 ^[a]	1.0
95	DDE-R ₈ -EQFLYH-S ₅ -LSFNAV	6.0 ^[a]	0.51
96	DDE-S ₅ -EQF-S ₅ -YHL-L*-SFN-A*-V	6.2 ^[a]	0.52
97	DDE-S ₅ -EQF-S ₅ -YHL-S ₅ -SFN-S ₅ -V	5.1 ^[a]	0.44
98	DDE-S ₅ -EQF-B ₅ -YHLLSF-S ₈ -AV	5.7 ^[a]	0.49
99	DDE-S ₅ -EQF-B ₅ -YHL-B ₅ -SFN-S ₅ -V	37 ^[b]	0.6
100A	DDE-S ₅ -EQF-B ₅ -YH-B ₅ -LS-S ₅ -NAV	62 ^[b]	1.0
100B	DDE-S ₅ -EQF-B ₅ -YH-B ₅ -LS-S ₅ -NAV	47 ^[b]	0.8

Die Dissoziationskonstanten der FITC-markierten Peptide wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mit erneut exprimiertem Rab8 bestimmt (N=1). Die erneut ermittelten K_D s des Referenzpeptids **79a** wichen vom ursprünglich bestimmten Wert ($22.2 \pm 1.2 \mu\text{M}$) ab. ^[a] K_D (**79a**) = 11.7 μM ; ^[b] K_D (**79a**) = 62 μM .

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Dortmund, den

Jochen Spiegel