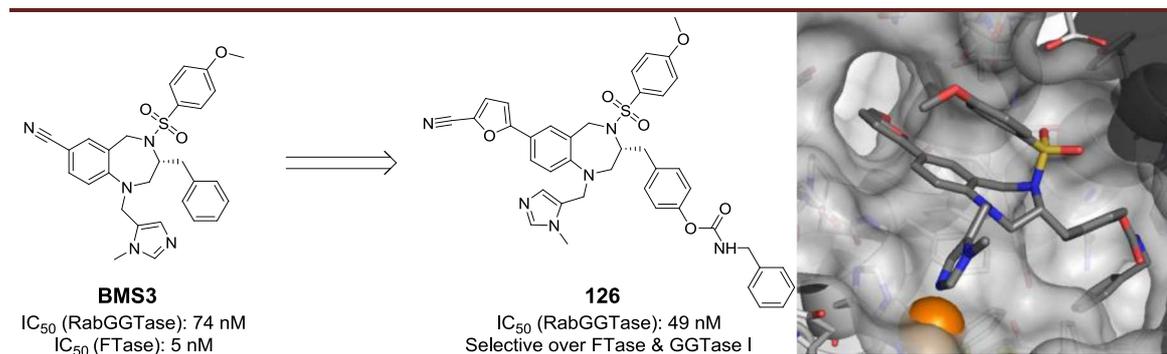


## Abstract



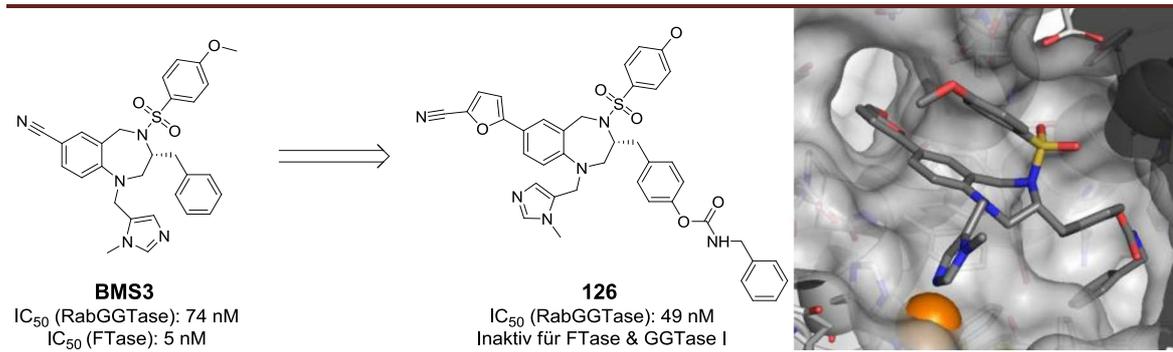
Rab GTPases are the main regulators of eukaryotic intracellular trafficking events. In the last decade, many Rab GTPases and their related proteins have been linked to cancer. In this research, attempts have been made to develop small molecules that interfere with Rab GTPase function by selective inhibition of the essential post-translational modifying enzyme, RabGGTase. These inhibitors are used as tools to verify RabGGTase as a potential anti-cancer target and could be used in a chemical biology approach to further study Rab-mediated processes.

RabGGTase and its related enzymes FTase and GGase I together represent the human prenyltransferases, involved in prenylation of the superfamily of small Ras GTPases. The most potent RabGGTase inhibitor known, **BMS3**, was originally designed as FTase inhibitor. Since **BMS3** lacks selectivity with respect to FTase, both *in vitro* and in cells, its pro-apoptotic effect could only be attributed to RabGGTase inhibition indirectly. In order to study the effects of selective RabGGTase inhibition on cancer cell proliferation and, more generally, Rab-mediated cellular processes, the main challenge was the design and synthesis of potent and selective RabGGTase inhibitors with cellular activity. Several approaches have been used in order to obtain such inhibitors. Using a structure-guided design, the scaffold of **BMS3** was decorated with additional groups to gain selectivity for RabGGTase. Going through iterative cycles of design, synthesis and biochemical and biological evaluation, several selective RabGGTase inhibitors were obtained, the most potent being inhibitor **126**. Other strategies to obtain selective RabGGTase inhibitors were evaluated with mixed success. The *in vitro* screening based on a fluorometric RabGGTase assay led mainly to identification of false positives, whereas a scaffold hopping approach resulted in a quick generation of a few prenyl transferase inhibitors with mixed activity toward RabGGTase, FTase or GGase I.

In order to verify the potential of selective RabGGTase inhibitors and to inspire drug discovery, several cancer cell lines were treated with **126**. It could be shown that **126** selectively inhibited cancer cell line proliferation without being generally cytotoxic to PBMC cells, thereby verifying RabGGTase as potential anti-cancer target.

The iterative effort of design, X-ray structure determination, synthesis and biological evaluation successfully allowed to convert a non-selective inhibitor into a potent, selective, not generally cytotoxic inhibitor. Selective RabGGTase inhibitors may be used as valuable chemical biology tools for further research on Rab mediated processes.

## Zusammenfassung



Rab-GTPasen sind die Hauptregulatoren intrazellulärer Transportvorgänge in eukaryotischen Zellen. Im Laufe des letzten Jahrzehnts wurden zahlreiche Rab-GTPasen und mit ihnen verwandte Proteine mit der Entstehung von Krebs in Verbindung gebracht. In der vorliegenden Arbeit wurden selektive Inhibitoren für die RabGGTase entwickelt, ein Enzym das für die korrekte Funktion von Rab-GTPasen unabdingbar ist. Diese Inhibitoren wurden benutzt, um die RabGGTase als krebisrelevantes Protein zu bestätigen und könnten als Werkzeuge für die Untersuchung Rab-vermittelter Prozesse im Sinne eines chemische biologischen Ansatzes eingesetzt werden. RabGGTase und die verwandten Enzyme FTase und GGTase I stellen die humanen Prenyltransferasen dar, die an der Prenylierung der Ras-GTPase-Superfamilie beteiligt sind. Der bisher wirksamste literaturbekannte RabGGTase Inhibitor **BMS3** wurde ursprünglich als Inhibitor für die FTase entwickelt. Da **BMS3** weder *in vitro* noch *in vivo* Selektivität für FTase besitzt, konnte sein proapoptotischer Effekt nur indirekt der Inhibition der RabGGTase zugeordnet werden. Um den Effekt selektiver RabGGTase-Inhibition auf die Proliferaton von Krebszellen und allgemein auf Rab-vermittelte zelluläre Prozesse zu untersuchen, lag der Hauptfokus der vorliegenden Arbeit auf dem Design und der Synthese hochaffiner, selektiver RabGGTase-Inhibitoren mit zellulärerAktivität. Mehrere Herangehensweisen zurEntwicklung derartiger Inhibitoren wurden verwendet. In einem strukturgeleitetem Ansatz wurde **BMS3** mit zusätzlichen funktionellen Gruppen versehen, um die Selektivität für RabGGTasen zu erhöhen. Nach wiederholten Zyklen von Design, Synthese und biochemischensowie biologischen Tests wurden einige selektive RabGGTase Inhibitoren erhalten, von denen **126** der stärkste Inhibitor war. Andere Strategien zur Entwicklung selektiver Inhibitoren führten zu unterschiedlichem Erfolg. Ein fluorometrischer *in vitro* RabGGTase Aktivitätsassay führte hauptsächlich zu falsch-positiven Ergebnissen. Ein Ansatz nach dem Prinzip des “scaffold hopping“

fürhte zu Inhibitoren mit wechselnder Selektivität gegenüber RabGGTase, FTase oder GGTase I.

Um das Potential selektiver RabGGTase Inhibitoren als Startpunkte für die Wirkstoffentwicklung zu bestätigen, wurden Krebszelllinien mit **126** behandelt. Es konnte gezeigt werden, dass **126** selektiv die Proliferation von Krebszellen hemmt, ohne generell toxisch für PBMC-Zellen zu sein. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der RabGGTase als vielversprechendes Zielprotein in der Bekämpfung von Krebs.

Wiederholte Zyklen von Design, Kristallographie, Synthese und biologischer Evaluierung ermöglichten es einen unselektiven Inhibitor in einen hochaktiven, selektiven nicht generell toxischen Inhibitor umzuwandeln. Die hergestellten Inhibitoren stellen wichtige Werkzeuge für die chemisch-biologische zukünftige Erforschung von durch Rab vermittelte Prozesse dar.