

4 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Substratspezifität des Acylierungszyklus peripherer Membranproteine. In vorangegangenen Arbeiten erwies sich die Maschinerie, die die Palmitoylierung und Depalmitoylierung der Ras-Proteine steuert als sehr substrattolerant, sodass im Rahmen dieser Arbeit die eventuellen Grenzen dieser Maschinerie ausgelotet werden sollten. Hierfür wurden einfach und doppelt lipidierte N-Ras-Proteinsonden in einer Kombination aus Molekularbiologie und organischer Chemie synthetisiert, in deren C-Termini verschiedene nicht-natürliche Elemente eingebaut wurden. Die entsprechenden lipidierten Peptidsequenzen wurden an fester Phase aufgebaut, wobei anfänglich eine manuelle Synthese am Hydrazinharz durchgeführt wurde, die in mehreren Schritten automatisiert wurde. Da die Synthese am Hydrazinharz aufgrund einer Nebenreaktion im Zuge der Abspaltungsreaktion teilweise relativ niedrige Ausbeuten liefert, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. G. Triola eine neue Methode für die Synthese lipidierte N-Ras-Peptide entwickelt. Diese nutzt das 2-Chlortritylchloridharz, an dem die erste, in der Regel farnesylierte Aminosäure immobilisiert wird. Nach dem automatisierten Aufbau der Sequenz wird das Lipopeptid als Carbonsäure freigesetzt und im Anschluss an die Aufreinigung mittels präparativer HPLC-MS bzw. Säulenchromatographie mit Trimethylsilyldiazomethan in den C-terminalen Methyl-ester überführt.

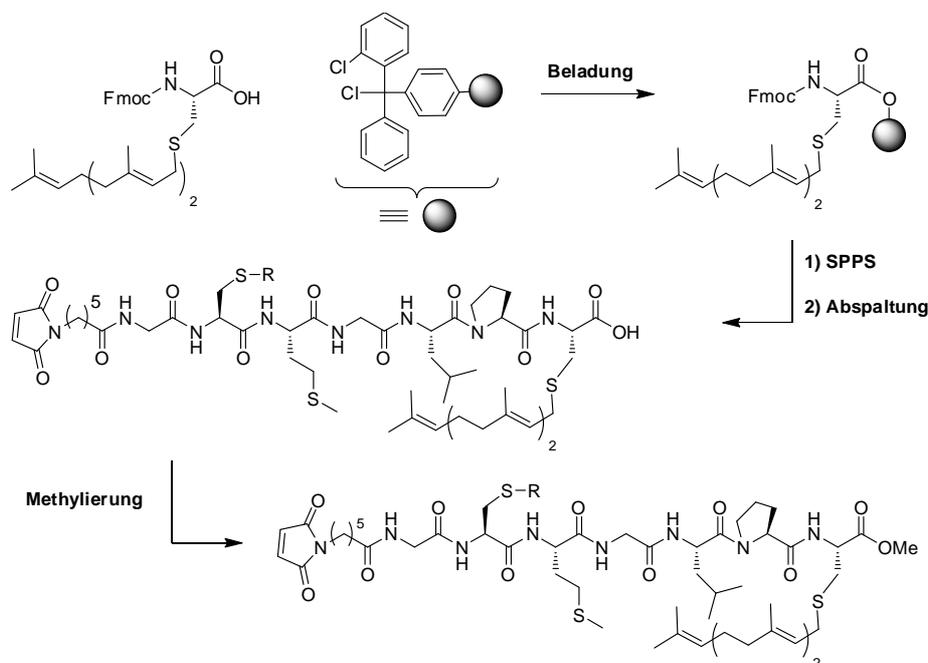


Abbildung 59: Strategie der neu entwickelten Synthese für das lipidierte Heptapeptid von N-Ras am 2-Chlortritylchloridharz mit anschließender Methylierung in Lösung

Für die Synthese der lipidierten Peptidsequenzen wurde die Strategie der prälipidierten Bausteine genutzt, daher wurden effiziente Synthesewege für die nicht-natürlichen Elemente im präparativen Maßstab entwickelt. Im Rahmen der Synthese der benötigten Fmoc-geschützten Bausteine war die Entwicklung einer neuen Methode für die Bildung unsymmetrischer Disulfide notwendig, da die bekannten Strategien bei der Disulfidbildung zwischen zwei tertiären Thiolen versagten. Abhilfe konnte der Einsatz von Dimethylsulfoxid als Oxidationsmittel schaffen und durch den Einsatz von Mikrowellenstrahlung wurde vollständiger Umsatz binnen 5 min erreicht. Abbildung 60 zeigt die synthetisierten Proteinsonden. Es wurde eine vollständige Serie peptoid-haltiger Proteine in farnesylierter und sowohl farnesyliert als auch palmitoylierter Form hergestellt. Die einfach farnesylierten Peptid-/Peptoidsequenzen (**39**, **45**, **41** und **43**) wurden sowohl an Cy3-fluoreszenz-markiertes, verkürztes N-Ras-Wildtypprotein als auch an die verkürzte G12V-Mutante ligiert. Die doppelt lipidierten, peptoidischen Sequenzen (**52**, **54**, **56** und **47**) sowie die weiteren nicht-natürlichen Modifikationen (**88**, **95** und **104**) wurden ausschließlich an das fluoreszenz-markierte, verkürzte N-Ras-Protein ligiert.

In einem *in vitro*-Assay wurde unter Verwendung eines semisynthetischen, farnesylierten und palmitoylierten N-Ras-Proteins die Depalmitoylierungsaktivität von APT 1, APT 2 und LYPLAL 1 untersucht. Die Acylproteinthioesterasen APT 1 und APT 2 akzeptieren N-Ras als Substrat im Gegensatz zu LYPLAL 1, das die Depalmitoylierung von N-Ras, zumindest *in vitro*, nicht katalysiert. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die palmitoylierten Modifikationen (**8**, **10**, **12**, **14** und **90**) ebenfalls hinsichtlich ihrer Eignung als Substrat für APT 1 und APT 2 getestet und die kinetischen Parameter bestimmt. Sowohl APT 1 als auch APT 2 wiesen dabei hohe Substrattoleranz auf. Die peptoidhaltigen Proteine (**8**, **10**, **12**, **14**) und das Biphenylderivat **90** wurden depalmitoyliert. Alle betrachteten Reaktionen wiesen unter Verwendung von APT 2 eine etwa doppelt so hohe Reaktionsgeschwindigkeit wie mit APT 1 auf.

Die einfach lipidierten peptoidischen Proteinsonden (**59**, **60**, **61** und **62**), die an die G12V-Mutante ligiert worden waren, wurden in einem Differenzierungsassay in PC12-Zellen untersucht. Es wurde für alle Modifikationen eine verminderte biologische Aktivität festgestellt, wobei diese am stärksten bei dem Protein **62**, in dem alle Aminosäuren ausgetauscht wurden, auftrat und am wenigsten ausgeprägt bei der Modifikation **61**, in der das Methionin und Leucin zwischen den lipidierten Cysteinen ersetzt wurde. Die Proteine **59** und **60**, deren lipidierte Cysteine jeweils durch die entsprechenden Peptoideinheiten ersetzt worden waren, zeigten etwa ein Viertel weniger neuronalen Auswuchs.

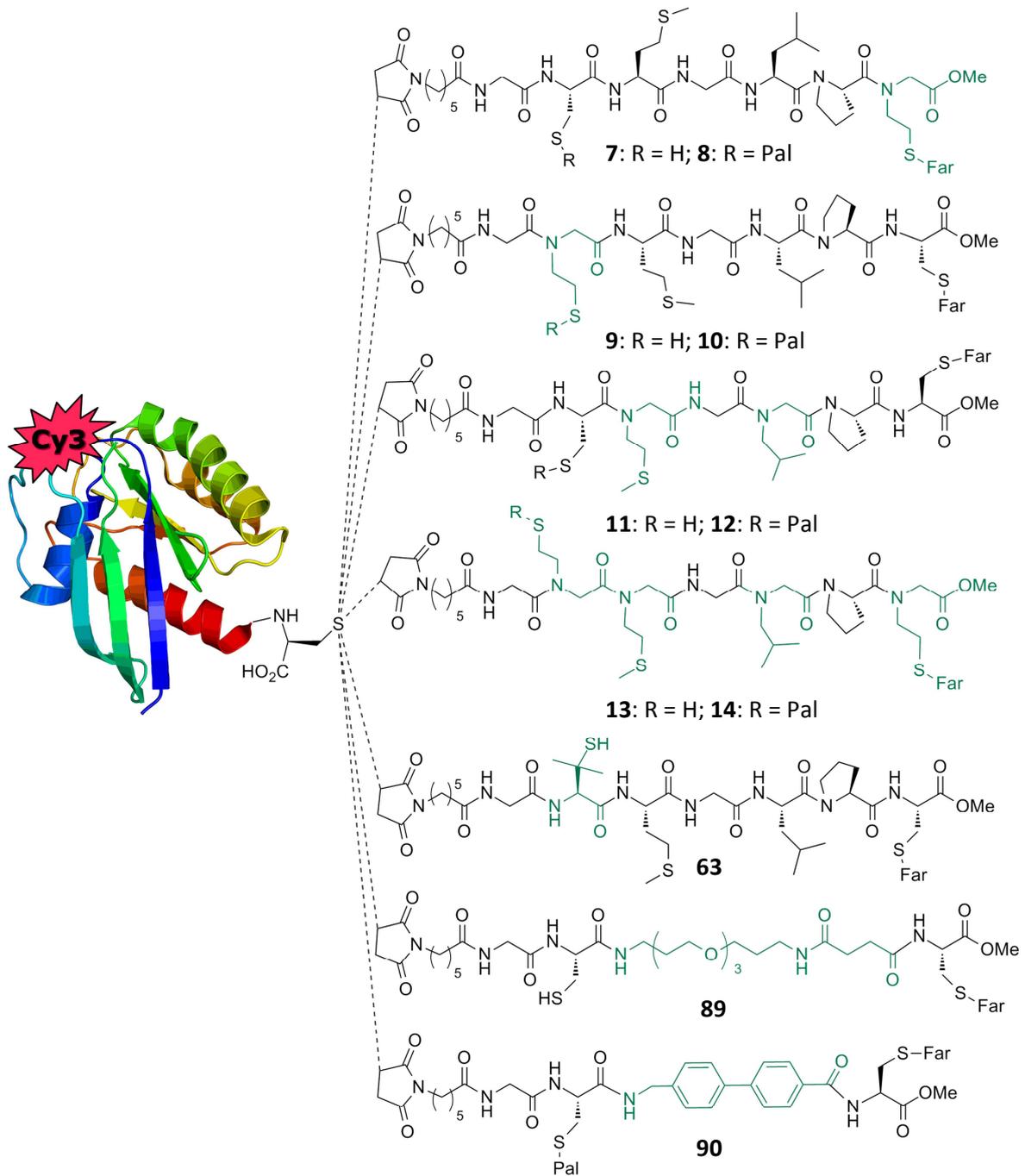


Abbildung 60: Übersicht über die Cy3-markierten, semisynthetischen N-Ras-Proteinsonden mit nicht-natürlichem C-Terminus.

In einer Kooperation mit der Abteilung für systemische Biologie am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie wurden die einfach lipidierten, peptoidischen Proteine (**7**, **9**, **11** und **13**) sowie die weiteren Derivate mit nicht-natürlichem C-Terminus (**63**, **89** und **90**) von Dr. N. Vartak in MDCK-Zellen mikroinjiziert und mittels Konfokalmikroskopie hinsichtlich ihrer Lokalisierung untersucht. Die peptoidischen Sonden (**7**, **9**, und **13**) zeigten nicht die N-Ras-typische Verteilung. Jedoch wurde bei allen Sonden eine signifikante Akkumulation am Golgi-Apparat beobachtet, sodass

sich daraus schließen lässt, dass diese Analoga nur unzureichend palmitoyliert werden können und dementsprechend sich nicht, wie für das native N-Ras üblich, an der Plasmamembran anreichern. Lediglich das Derivat **11** zeigte eine dem nativen N-Ras ähnliche Verteilung in den Zellen, was die Hypothese zulässt, dass Veränderungen zwischen den beiden lipidierten Cysteinen von der De-/Re-palmitoylierungsmaschinerie toleriert werden. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen der Mikroinjektion von **89**, bei der eine dem transfizierten N-Ras nahezu identische Lokalisation für die injizierte Sonde beobachtet wurde. Im Gegensatz dazu wurde das Protein **90**, vermutlich aufgrund des starren Biphenyllinkers, nicht prozessiert, sondern verteilte sich unspezifisch über alle Endomembranen. Ähnliches zeigte sich auch für das Penicillamin-Derivat **63**, hier scheiterte die Prozessierung vermutlich an der sterisch höchstanspruchsvollen Umgebung des zu palmitoylierenden Thiols. Die Maschinerie, die den Acylierungszyklus reguliert, weist zusammenfassend eine relativ hohe Substrattoleranz auf, speziell der Bereich zwischen der Farnesylierungs- und Palmitoylierungsstelle scheint für die involvierten Enzyme nicht relevant zu sein. Die lipidierten Cysteine hingegen scheinen weniger Veränderungen zu tolerieren und es lässt sich vermuten, dass der C-Terminus über einen gewissen Grad an konformativer Freiheit verfügen muss, damit das zu palmitoylierende Cystein für die Acylierung zugänglich ist.

In dieser Arbeit konnten damit erstmals Restriktionen des Acylierungszyklus gefunden werden. Die den Depalmitoylierungsschritt katalysierenden Enzyme APT 1 und APT 2 wiesen *in vitro* sehr hohe Substrattoleranz auf, sodass sich vermuten lässt, dass die für die Palmitoylierung verantwortlichen Proteine ein engeres Substratspektrum aufweisen und somit für die Regulation der Acylierung zuständig sein könnten.