

Lipidierte Ras- und Rab-Peptide und -Proteine: Synthese, Struktur und Funktion

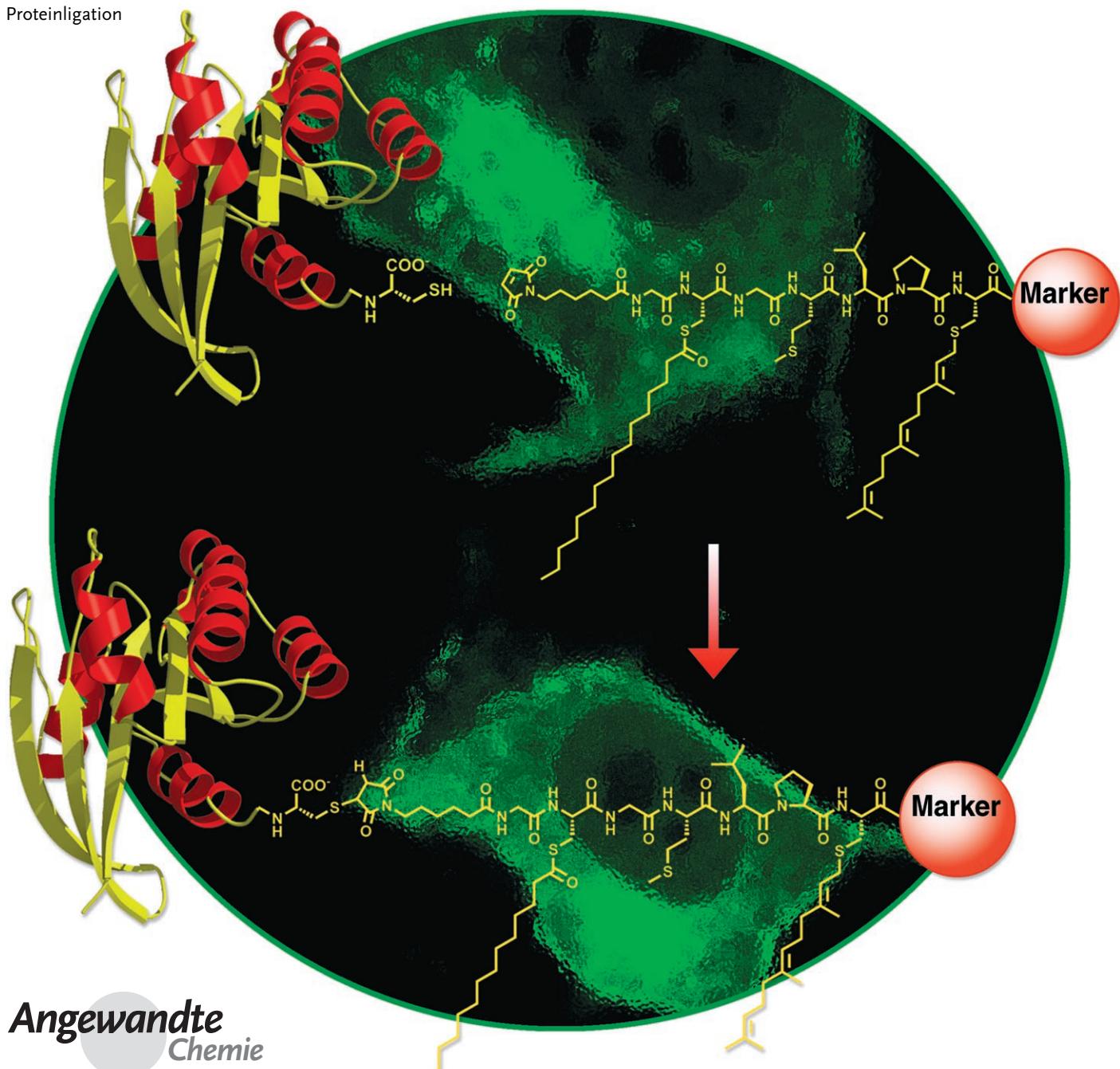
Luc Brunsdorf, Jürgen Kuhlmann, Kirill Alexandrov, Alfred Wittinghofer,
Roger S. Goody und Herbert Waldmann*

Stichwörter:

Bioorganische Chemie · GTPasen ·

Lipoproteide · Lipoproteine ·

Proteinligation



Die chemische Biologie kann als das Studium biologischer Vorgänge mit chemischen Methoden definiert werden. Hierbei werden durch Analyse biologischer Phänomene und ihrer strukturellen Grundlagen ungelöste Probleme erkannt und mithilfe kombinierter Techniken aus der Chemie und der Biologie zu lösen versucht. Im Zuge solcher Studien werden neue Synthesemethoden und -strategien entwickelt und zur Herstellung von Verbindungen verwendet, die zur Erforschung biologischer Vorgänge eingesetzt werden. Mit dieser Definition als Leitmotiv fassen wir in diesem Aufsatz die neuesten Erkenntnisse auf dem Gebiet der chemischen Biologie lipidierter Ras- und Rab-Proteine zusammen. Festphasensynthesen haben sich als die bevorzugten Methoden zur Synthese lipidmodifizierter Peptide erwiesen, die über chemisch-biologische Methoden chemoselektiv an Proteine der Ras-Superfamilie ligiert werden können. Mithilfe dieser synthetischen Peptide und Proteine ist es gelungen, ungelöste Fragen auf dem Gebiet der Ras-Superfamilie der GTPasen aufzuklären, die durch chemische oder biologische Methoden alleine nicht zu erschließen waren.

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	6775
2. Synthese lipidierter Ras- und Rab-Peptide	6777
3. Synthese lipidierter Ras- und Rab-Proteine	6785
4. Biophysikalische Studien mit lipidierten Peptiden	6788
5. Strukturelle und biologische Studien an lipidierten Ras- und Rab-Proteinen	6790
6. Ras-Proteine als Reagenzien in der Zellbiologie	6792
7. Zusammenfassung und Ausblick	6795

1. Einleitung

Die Ras-GTPasen (Ras = rat adeno sarcoma) gehören zur Klasse der monomeren G-Proteine, die an zellulären Prozessen wie Vesikeltransport, Zellzyklus, Kernimport und Signaltransduktion beteiligt sind.^[1] G-Proteine nehmen durch Komplexierung von GTP (Guanosintriphosphat) ihren aktiven Zustand ein, während die Bindung von GDP (Guanosindiphosphat) ihren inaktiven Zustand stabilisiert. Die aktive Form agiert, indem sie über Wechselwirkungen mit Effektoren Zellvorgänge stimuliert oder inhibiert. Eine Fehlregulierung dieser molekularen Schalter hat oft verheerende Auswirkungen. Beispielsweise treten in Krebszellen häufig mutierte Ras-Proteine auf, die im GTP-gebundenen Zustand arretiert sind^[2] und daher unaufhörlich in ihrer aktiven Form vorliegen, was – neben zusätzlichen Störungen bei Signaltransduktionsvorgängen – zu unkontrolliertem Zellwachstum führt.

Mitglieder der Ras-Superfamilie werden durch Prenylierungen und in einigen Fällen durch Acylierungen posttranslational modifiziert.^[3,4] Die Ras-Proteine bilden eine Untergruppe der Ras-Superfamilie, bestehend aus den drei Isoformen H-, N- und K-Ras sowie R-Ras, TC21, Rheb und den Rap- und Ral-Proteinen.^[5] Nach vollständiger posttranslationaler Modifizierung sind die Proteine an der Innenseite der Plasmamembran lokalisiert. Die Aminosäuresequenzen der Ras-Proteine unterscheiden sich hauptsächlich in der C-terminalen Region. Dieser offenbar in Lösung unstrukturierte Terminus enthält die Signalsequenz für die posttranslationalen Modifikationen. Ebenfalls zur Ras-Superfamilie gehört die Familie der Rho-Proteine (Ras-homologe Proteine), die an der Organisation des Actin-Cytoskeletts beteiligt sind.^[6] Die umfangreichste Untergruppe der Ras-Superfamilie bilden die Rab-Proteine (Ras gene from rat brain) mit mehr als 60 Mitgliedern.^[7] Sie sind am vesikulären Transport in-

nerhalb der Zelle beteiligt und in vielen Fällen in spezifischen Kompartimenten der sekretorischen und endocytotischen Reaktionswege lokalisiert.^[8] Die Ran-Proteine (Ras-verwandte Zellkernproteine) sind die bislang einzigen Mitglieder der Ras-Superfamilie, für die keine posttranskriptionale Modifizierung bekannt ist. Sie spielen eine Rolle bei der Regulation des Kernimports und -exports.^[9,10] Abbildung 1 gibt eine Übersicht über die zur Ras-Superfamilie gehörenden Proteine und ihre Funktionen.

Die drei am häufigsten in der Ras-Superfamilie vorkommenden posttranskriptionalen Lipidmodifizierungen sind *N*-Myristoylierung, *S*-Palmitoylierung und *S*-Isoprenylierung.^[11–13] Isoprenylierung und Myristoylierung sind stabile (nichtreversible) Modifizierungen, während die Palmitoylierung reversibel ist.^[14,15] Zusätzlich werden einige dieser Proteine posttranskriptional in C-terminale Methylester überführt.

[*] Prof. Dr. H. Waldmann
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)
und
Fachbereich Chemie
Universität Dortmund
Otto-Hahn-Straße 6, 44221 Dortmund (Deutschland)
Fax: (+49) 231-133-2499
E-Mail: herbert.waldmann@mpi-dortmund.mpg.de
Dr. L. Brunsveld
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund
und
Chemical Genomics Centre
Otto-Hahn-Straße 15, 44227 Dortmund (Deutschland)
Dr. J. Kuhlmann, Dr. K. Alexandrov, Prof. Dr. A. Wittinghofer,
Prof. Dr. R. S. Goody
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)

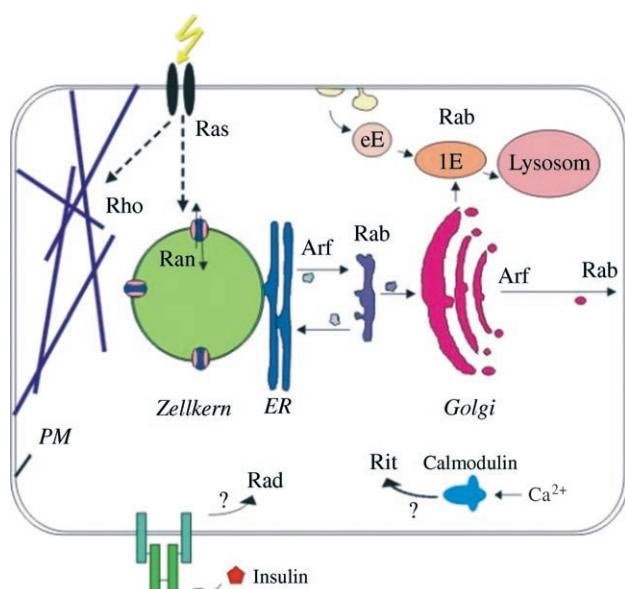


Abbildung 1. Proteine der Ras-Superfamilie und ihre Lokalisierung und Funktion in der zellulären Umgebung. eE: frühes (early) Endosom, IE: spätes (late) Endosom, PM: Plasmamembran, ER: endoplasmatisches Retikulum, Arf: ADP-Ribosylierungsfaktor, Rit: Ras-ähnliches Protein in Gewebe, Rad: Ras-verwandtes diabetesassoziiertes Protein.

In Schema 1 sind einige typische posttranskriptionale Modifikationen aufgeführt, die an den C-Termini von Proteinen der Ras-Superfamilie auftreten.

Bei Mitgliedern der Ras-Superfamilie führt die Lipidierung der C-Termini zur Membranassoziation der posttrans-

lational modifizierten Proteine. Diese posttranskriptionalen Modifikationen sind essenziell für die Proteinfunktion. Dennoch wurden bis vor kurzem die meisten Experimente – Röntgenstrukturanalyse, NMR-Studien und biochemische Charakterisierung – nur mit dem löslichen Teil der Proteine, d.h. dem Protein ohne C-Terminus, durchgeführt. Die damit erhaltenen Ergebnisse können die tatsächliche Situation höchstens annähernd wiedergeben, besonders weil die Diversität zwischen den einzelnen Mitgliedern häufig auf dem lipidierten C-Terminus des Proteins beruht. Die biochemische Erzeugung vollständig funktionalisierter und modifizierter lipidierter Proteine ist aber schwierig, zeitintensiv und führt im Fall der S-Palmitoylierung zu heterogenen Gemischen und ist daher in den meisten Fällen unpraktikabel oder nicht anwendbar. Dagegen sind in den letzten Jahren chemisch-biologische Methoden entwickelt worden, die Zugang zu voll funktionsfähigen lipidierten Proteinen und zusätzlich zu nichtnatürlichen Modifikationen bieten und damit die Untersuchung der vollständigen funktionalen Proteine ermöglichen.^[16,17] Ausschlaggebend hierfür waren zwei mehr oder weniger parallel verlaufene Entwicklungen: 1) Fortschritte in der Proteinligation und der chemischen Proteinsynthese (Thema vieler Übersichtsartikel^[18] und hier nur in Verbindung mit den Proteinen der Ras-Superfamilie diskutiert); 2) Fortschritte bei der Synthese lipidierter Peptide, sowohl in Lösung als auch an festen Trägern. Diese Weiterentwicklungen und ihre Anwendung zur Klärung biochemischer, biophysikalischer und biologischer Vorgänge unter Beteiligung von Proteinen der Ras-Superfamilie stehen im Mittelpunkt dieses Aufsatzes. Zunächst werden wir die bei der Synthese



Luc Brunsveld wurde 1975 in Culemborg, Niederlande, geboren. Nach seiner Promotion 2001 in supramolekularer Chemie an der Eindhoven University of Technology bei Bert Meijer war er Postdoc in der Arbeitsgruppe von Herbert Waldmann am MPI in Dortmund (2001–03) und forschte anschließend bei der Firma Organon auf dem Gebiet der medizinischen Chemie (2003–04). Seit 2005 leitet er eine Arbeitsgruppe am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund. Seine Forschungsinteressen gelten der supramolekularen Chemie und der chemischen Biologie.



Kirill Alexandrov wurde 1967 in Leningrad geboren und studierte Zoologie an der dortigen Staatsuniversität (Master 1989). Bis 1992 arbeitete er als Techniker am Institut für Zytologie in Leningrad und am Dana-Farber-Krebsinstitut in Boston und wechselte dann an das Europäische Laboratorium für Molekulare Biologie in Heidelberg, wo er 1996 in Zellbiologie promovierte. 1997 wechselte er als Postdoc an das Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund, wo er seit 1999 eine Arbeitsgruppe leitet.



Jürgen Kuhlmann, geboren 1962 in Schwerin, studierte Chemie an der Universität Dortmund und promovierte bei A. Maelicke am Max-Planck-Institut für Ernährungsphysiologie über die Kinetik und Thermodynamik der Ligandbindung des nikotinischen Acetylcholinrezeptors. Nach einer Tätigkeit als Qualitätsicherungsberater in einem umweltanalytischen Labor wurde er Leiter der Abteilung für biophysikalische Analyse in der Abteilung Strukturelle Biologie am MPI für molekulare Physiologie. 2002 habilitierte er in biophysikalischer Chemie an der Ruhr-Universität Bochum, wo er als Privatdozent an der Fakultät für Chemie lehrt.



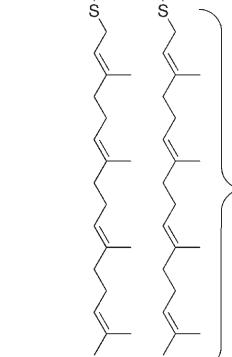
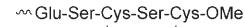
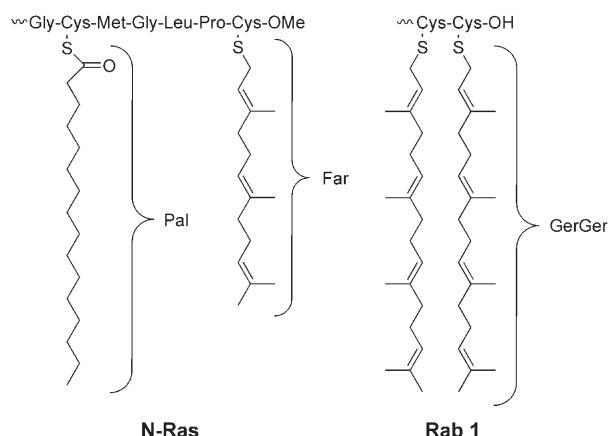
Alfred Wittinghofer wurde 1943 in Goch, Deutschland, geboren. Er studierte Chemie in Aachen und promovierte dort bei Prof. H. Zahn am Deutschen Wollforschungsinstitut über die Synthese der A-Kette von Insulin. An ein dreijähriges Postdoktorat bei Dr. R. Hiskey an der University of North Carolina (Semisyntese von Insulin) schlossen sich einige Jahre als Postdoc am Max-Planck-Institut für medizinische Forschung in Heidelberg an (Phosphoryltransferasen). Nach dem Aufbau einer eigenen Arbeitsgruppe begann er seine Forschungen zu Ras und Ras-ähnlichen GTP-bindenden Proteinen. 1992 wurde er Direktor am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie.

dieser lipidierten Peptide erzielten Fortschritte erörtern. Aus chemischer Sicht liegt der Schwerpunkt auf der Anwendung von Methoden aus der Festphasenchemie lipidmodifizierter Peptide auf die chemische Biologie lipidierter Ras-GTPasen. Umfassende Übersichten zur bisherigen Entwicklung von lösungsbasierten Ansätzen sind in der neueren Literatur zu finden.^[19-24] Im Anschluss an die Besprechung der Peptidsynthese wird beschrieben, wie diese Peptide zur Bildung vollständig lipidierter oder modifizierter Proteine der Ras-Superfamilie eingesetzt werden. Der letzte Teil dieses Aufsatzes stellt ausgewählte Beispiele für biophysikalische, biologische und strukturelle Studien vor, die auf diese Peptide und semisynthetischen Proteine zurückgreifen. Außerdem befassen wir uns mit der Verwendung nichtnatürlicher Strukturelemente innerhalb der lipidierten Proteinsegmente.

2. Synthese lipidierter Ras- und Rab-Peptide

In den letzten zehn Jahren wurden viele Synthesestrategien zur Herstellung lipidierter Peptide entwickelt. Methoden in Lösung und an festen Trägern sind in mehreren Übersichtartikeln zusammengefasst,^[19, 20, 25, 26] und es ist daher nicht unser Ziel, eine umfassende Übersicht zu geben, sondern eher die grundlegenden Ansätze aufzuzeigen und zu vergleichen, die zur Synthese lipidierter Peptide führen können.

Zur Synthese lipidierter Peptide aus der Ras-Superfamilie stehen mehrere Strategien zur Auswahl. Man kann sich entscheiden zwischen 1) Festphasenmethoden oder Ansätzen in Lösung, 2) dem Einsatz lipidierter Bausteine oder einer



Schema 1. C-terminale Lipidmotive für N-Ras, Rab1 und Rab7. Pal = Palmitoyl, Far = Farnesyl, GerGer = Geranylgeranyl. Das C-terminale Cystein liegt entweder als Carbonsäure oder als Methylester vor.



Roger Goody wurde 1944 in Northampton, England, geboren und studierte 1962–1968 Chemie an der University of Birmingham. Nach seiner Promotion 1968 und mehreren Postdoktoraten habilitierte er in Biochemie/Biophysik an der Universität Heidelberg, wo er 1990 zum Professor ernannt wurde. Seit 1993 ist er Direktor am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund. 2004 wurde er als Professor für Biochemie an die Ruhr-Universität Bochum berufen. Seine Forschungsinteressen gelten phosphatübertragenden Reaktionen.



Herbert Waldmann promovierte 1985 an der Universität Mainz bei Prof. H. Kunz in organischer Chemie. Nach einem Postdoc-Aufenthalt bei Prof. G. Whitesides in Harvard habilitierte er 1991 und wurde zunächst als Professor für organische Chemie an die Universität Bonn und dann 1993 an die Universität Karlsruhe berufen. 1999 wurde er Direktor am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie und Professor für organische Chemie in Dortmund. Seine Hauptforschungsinteressen gelten Verbindungsbibliotheken, Festphasensynthesemethoden und Ras-Proteinen.

Lipidierung nach Peptidaufbau und 3) der Boc- oder der Fmoc-Strategie. Die Wahl der geeigneten Strategie hängt ab von der Art und Position der Lipidgruppen innerhalb der Peptidstruktur, von der Peptidlänge, der C-terminalen Funktion und dem Vorhandensein zusätzlicher funktioneller Gruppen wie Fluoreszenzmarkern oder Spinlabels. Was insbesondere die Lipide und funktionellen Gruppen betrifft, muss die Synthesestrategie an die Labilitäten der Modifikationen angepasst sein. Bei Festphasensynthesen ist die Wahl des Linkers zum Harz ein zusätzliches Kriterium, das bei der Syntheseplanung zu berücksichtigen ist.

Für lipidierte Peptide lassen sich einige allgemeine Richtlinien formulieren: 1) Schutzgruppen oder Linker, die gegen (starke) Säuren labil sind, können nicht zusammen mit Prenylgruppen verwendet werden; 2) das gleiche gilt für Schutzgruppen, die unter hydrogenolytischen Bedingungen entfernt werden müssen; 3) Thioester wie an Cystein gebundene Palmitoylgruppen sind labil gegenüber starken Nucleophilen (siehe Schema 2 und Schema 4). Weitere Faktoren, die beachtet werden müssen, sind: 4) die Eigenschaften anderer funktioneller Gruppen wie Fluorophore, photoaktivierbare Gruppen und Tags für die Verknüpfung mit Proteinen; 5) Diketopiperazinbildung prenylierter Dipeptidester durch *N*-terminale Entschützung; 6) die unerwünschte *S,N*-

Acylverschiebung der Palmitoylgruppe bei einem N-terminal unmaskierten Cystein.

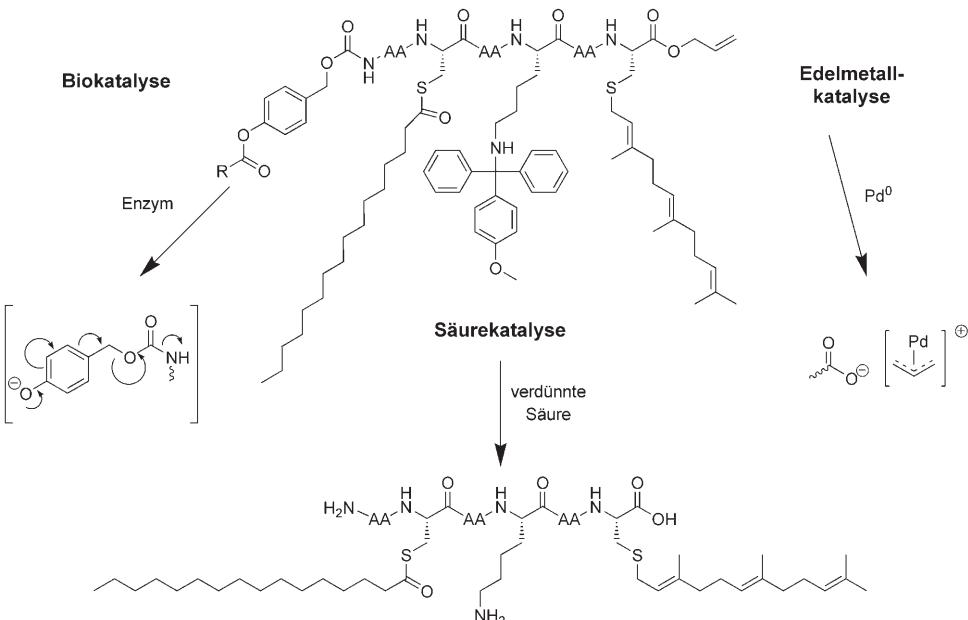
Angesichts dieser Eigenschaften und Einschränkungen könnte man sich fragen, ob eine allgemeine Strategie zur Synthese lipidierter Peptide der Ras-Superfamilie überhaupt entwickelt werden kann. Im folgenden Abschnitt werden wir einige der neueren Ansätze erörtern, die hierfür erprobt wurden. Wir werden versuchen, allgemeingültige Ansätze aufzuzeigen, die den durch die Peptide auferlegten Anforderungen genügen. Im Mittelpunkt stehen Festphasenmethoden, die nach unserer Erfahrung einen schnelleren und flexibleren Weg zu mehrfach lipidierten Peptiden bieten als Methoden in Lösung liefern.

2.1. Methoden in Lösung

Die zur Herstellung lipidierter Peptide in Lösung verwendeten Synthesestrategien zeigen Parallelen zu Lösungssynthesen gewöhnlicher Peptide. Grundlegende Studien zur Synthese lipidierter Peptide in Lösung und die biologische Anwendung der synthetisierten Peptide haben Silivius et al. beschrieben.^[27-32]

Die Einführung der Lipidgruppen kann auf zwei Wegen erfolgen: Entweder werden prälipidierte Aminosäuren unter üblichen Bedingungen gekuppelt, oder es werden selektiv entschützte Peptide nach beendeter Synthese des Rückgrats mit Lipiden verknüpft. Peptide mit nur einer Art von Lipidmodifikation können normalerweise relativ unkompliziert mit üblichen Schutzgruppentechniken in Lösung synthetisiert werden. Palmitoylthioester sind unter sauren Bedingungen stabil, weshalb klassische säurelabile Schutzgruppen wie die Boc-Gruppe eingesetzt werden können. Prenylthioether sind bei pH > 7 inert, was die Verwendung baselabiler Schutzgruppen (z.B. Fmoc), stark säurelabiler Schutzgruppen (z.B. von der Tritylgruppe abgeleitete) und anderer orthogonaler Gruppen wie z.B. enzymlabiler oder edelmetalllabiler Schutzgruppen ermöglicht. Myristoylamide schließlich sind sowohl mit sauren als auch basischen Reaktionsbedingungen kompatibel und bringen keinerlei Einschränkungen bezüglich der Schutzgruppenstrategie mit sich.

Peptide, die zwei Arten von Lipidmodifikationen oder anderen labilen funktionellen Gruppen enthalten, erfordern hingegen eine differenziertere Schutzgruppenstrategie. Viele Untersuchungen in Lösung haben sich mit diesem Problem befasst. Schema 2 gibt einen Überblick über Schutzgruppen,

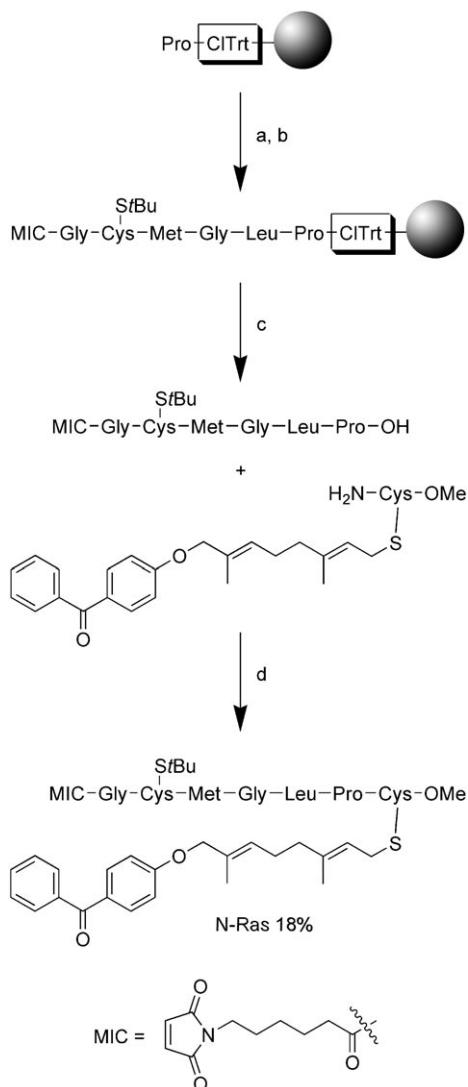


Schema 2. Überblick über die zu Prenyl- und Palmitoylmodifikationen orthogonalen Schutzgruppen, die bei der Lipopeptidsynthese mehrfach lipidierter Peptide in Lösung verwendet werden.

die sich für die Synthese vielfach funktionalisierter Peptide eignen. Ein kombinierter Einsatz enzymlabiler, edelmetall- oder äußerst säurelabiler Schutzgruppen hat sich als erfolgreiche Methode zur Synthese dieser anspruchsvollen Peptide in Lösung herausgestellt.^[21,33,34] Die Syntheseprotokolle verlangen ein gewisses Maß an Erfahrung und können sicher nicht als standardisiert angesehen werden. Allgemein lässt sich sagen, dass jedes lipidmodifizierte Peptid, das in Lösung synthetisiert werden soll, eine eigene Syntheseplanung und -optimierung verlangt. Hinzu kommt, dass Peptidsynthesen in Lösung arbeitsintensiv sind, nicht nur wegen der Optimierung der Reaktionsbedingungen und der Zahl an Kupplungsschritten, sondern auch wegen der zeitaufwändigen Reinigung der Zwischenstufen, die häufig tensidähnliche Eigenschaften aufweisen. Vereinzelt kann eine stark unterschiedliche Eigenschaft (z.B. die Hydrophobie) der Kupplungspartner genutzt werden, um die Trennung von Produkten und Ausgangsverbindungen zu erleichtern. In Anbetracht all dessen liegt der Schluss nahe, dass die Synthese vollständig lipidierter Peptide in Lösung zwar machbar ist, doch andere, flexiblere Methoden vorzuziehen sind, sowohl was den Zeitaufwand als auch die Gesamtausbeute angeht.

2.2. Kombinierte Lösungs/Festphasen-Methoden

Kombinierte Lösungs/Festphasen-Methoden können angewendet werden, um den Zeitaufwand von Peptidsynthesen in Lösung zu verringern. Bei diesen Ansätzen wird ein Großteil der Peptidsequenz schnell an einem festen Träger synthetisiert, abgespalten und mit lipidierten Aminosäuren in Lösung verknüpft oder durch Alkylierung freier Thiolseitenketten im Cystein lipidiert. Solche Methoden sind recht häufig eingesetzt worden und waren besonders erfolgreich bei



prenylierten Peptiden, wie Beiträge der Arbeitsgruppen um Naider,^[19,35] Gelb,^[36–38] Poulter^[39] und Waldmann gezeigt haben.^[40–43]

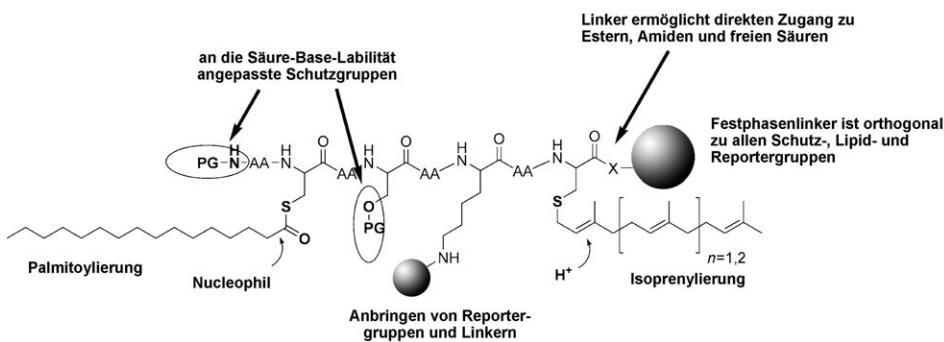
Ein typisches Beispiel für die Synthese eines prenylierten Peptids ist in Schema 3 dargestellt.^[41] Das synthetisierte C-terminale N-Ras-Peptid enthält ein lipidiertes Cystein am C-Terminus. Das Cystein wird in Lösung an den C-terminalen Teil des Peptids gekuppelt, das an einem festen Träger aufgebaut wurde. Der N-Terminus des Peptids wurde mit der MIC-Gruppe funktionalisiert, um eine Anbindung an ein Cystein der Ras-GTPase zu ermöglichen. Das Cystein des Peptids

wurde als *tert*-Butyldisulfid geschützt, da diese Schutzgruppe eine reduktive Spaltung unter physiologischen Bedingungen zulässt. Mit diesen Schutz- und funktionellen Gruppen lässt sich die endgültige Kondensation der Teilabschnitte relativ einfach ausführen. Dabei ist auf eine mögliche Racemisierung zu achten; die Wahl erprobter Kupplungsverfahren hat sich jedoch als ausreichend erwiesen, um eine Racemisierung zu verhindern oder weitestgehend einzudämmen.

Das in Schema 3 beschriebene Peptid ist strukturell nicht allzu anspruchsvoll, da abgesehen von den beiden Cysteinen keine der Aminosäuren reaktive Seitenketten trägt und kein ungeschütztes N-terminales Amin vorhanden ist. Ein kombiniertes Lösungen/Festphasen-Verfahren wird jedoch problematischer, wenn mehrfache Lipid-Anker in das Peptid eingeführt werden müssen oder wenn das Peptid zusätzliche Aminosäuren mit (reaktiven) polaren Seitenketten enthält. Abgesehen davon, dass zusätzliche Schritte in Lösung notwendig werden, kann die Orthogonalität der Schutzgruppen und funktionellen Gruppen problematisch werden und zu denselben Schwierigkeiten wie beim reinen Verfahren in Lösung führen.

2.3. Festphasenmethoden

Im Bereich der Synthese lipidierten Peptids hat sich der Fokus inzwischen zur Peptidsynthese an festen Trägern verschoben. Entscheidende Projekte befassten sich unter anderem mit dem Screening von Linkern und Abspaltungsbedingungen sowie der Untersuchung von Synthesewegen zur Einführung der Lipidgruppen mit einer geeigneten orthogonalen Schutzgruppenstrategie. Wie bei den Lösungsspannmethoden müssen die Schutzgruppen zu den Lipiden und anderen funktionellen Gruppen in den Peptiden orthogonal sein. Auch sollte der Linker zum Harz unter Bedingungen abspaltbar sein, die die Peptidfunktionalitäten nicht beeinträchtigen. Im idealen Fall würde die Abspaltung des Linkers zusätzlich die Einführung unterschiedlicher funktioneller Gruppen an der C-terminalen Carboxyfunktion zulassen. Die Anforderungen an eine Festphasenmethode bezüglich der Integrität der funktionellen Gruppen, Schutzgruppen und Linker sind in Schema 4 zusammengefasst. Die auf dem



Schemata 4. Überblick über die Anforderungen an eine allgemein anwendbare Festphasensynthesemethode für lipidierte Peptide aus der Ras-Superfamilie und charakteristische Reaktivität von Lipidfunktionalitäten. Die Doppelbindungen der Prenyllipide sind säureempfindlich, und der Thioester der Palmitoylgruppen wird durch Nucleophile angegriffen und gespalten.

Gebiet der Festphasensynthese lipidierter Peptide erhaltenen Ergebnisse werden in den folgenden Abschnitten besprochen; sie sind nach den untersuchten Linkern und der Methode zur Einführung der Lipidgruppen geordnet.

2.3.1. Linker-Strategien

Die Hauptschwierigkeit bei der Entwicklung einer universellen Festphasensynthesemethode für lipidierte Peptide besteht darin, einen Satz an geeigneten orthogonal stabilen Schutzgruppen zu bestimmen, sowie einen Linker, der die selektive Einführung unterschiedlicher Lipide und anderer funktioneller Gruppen ermöglicht (siehe Tabelle 1). Typische Festphasenanker wie der Wang-Linker und der Rink-Amid-Linker erfüllen diese Anforderungen nicht, da z. B. die Säure, die zur Abspaltung der Peptide von diesen Harzen benötigt wird, mit Prenylgruppen nicht verträglich ist. Andere Linker, wie jene, die auf der Tritylgruppe oder dem Sasrinharz basieren, lassen sich unter leicht sauren Bedingungen abspalten und sind daher kompatibel mit Prenyl- und Palmitoylgruppen, verhindern aber die Einführung funktioneller Gruppen am C-Terminus.

2.3.1.1. Kaisersches Benzophenonoximharz

Zur Synthese einer Bibliothek kleiner C-terminaler Ras-Peptide wurde das Kaisersche Benzophenonoximharz eingesetzt.^[44] Tetrapeptide mit einem N-terminalen *S*-farnesylier-

ten Cystein^[45] und ein ähnliches Tetrapeptid mit einem zusätzlichen Biotin-Tag^[46] wurden an diesem Harz rasch synthetisiert und unter leicht sauren Bedingungen mit L-Aminosäurebenzylestertosylaten vom Harz abgespalten. Die erforderliche *N*-Boc-Schutzgruppe schränkt jedoch die Flexibilität bezüglich der Platzierung der Prenylgruppen ein. Dieses Harz kann daher nur zur Synthese von Peptiden mit einer einzelnen, am N-Terminus des Peptids lokalisierten Prenylgruppe eingesetzt werden.

2.3.1.2. Trityl-Linker

Der Trityl-Linker ermöglicht die Abspaltung der synthetisierten Peptide unter leicht sauren Bedingungen, was mit den meisten Prenylgruppen vereinbar ist. Wenn das Peptid über seinen C-Terminus an den Trityl-Linker gebunden ist, entsteht bei der Spaltung die freie Carbonsäure. In diesem Fall lässt der Trityl-Linker die Bildung einer zusätzlichen funktionellen Gruppe am C-Terminus nicht zu. Wird das Peptid jedoch über eine der Aminosäureseitenketten, z. B. über die ε-NH₂-Gruppe von Lysin, am Harz verankert, kann der Linker zur Synthese lipidierter Peptide mit funktionalen C-Termini eingesetzt werden.^[47,48]

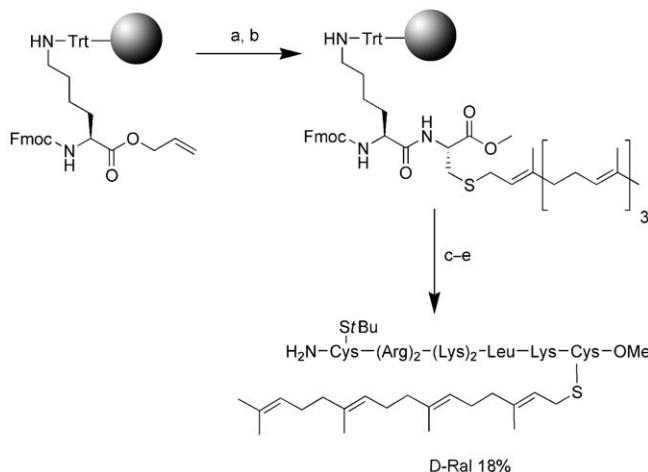
Diese Methode ist vor allem zur Synthese von lipidierten Peptiden mit mehreren basischen Seitenketten verwendet worden. Die Synthese solcher Peptide, beispielsweise der lipidierten C-Termini von Rho A, K-Ras4B und D-Ral, basiert auf der Verankerung einer Lysinseitenkette der mehr-

Tabelle 1: Charakteristische Eigenschaften einiger Ankergruppen in der Synthese lipidierter Peptide der Ras-Superfamilie.

	Oxim	Trityl	Hydrazinobenzoyl	Ellman-Sulfonamid
Struktur				
Abspaltungsbedingungen	Amine	schwache Säuren	Oxidation und ein Nucleophil	Alkylierung des Linkers und ein Nucleophil
C-terminale Spaltprodukte	Amide	Säure oder Ester und Amide (wenn über Seitenkette am Peptid verankert)	Säure, Ester, Amide	Säure, Ester, Amide
Spaltung ist orthogonal zu:	säurelabilen Gruppen (Far, Boc), edelmetallablen Gruppen (z. B. Aloc)	säurelabilen Gruppen (Far, Boc), baselabilen Gruppen (z. B. Fmoc, Pal), edelmetallablen Gruppen (z. B. Aloc)	säurelabilen Gruppen (z. B. Far, Boc), baselabilen Gruppen (z. B. Fmoc, Pal), edelmetallablen Gruppen (z. B. Aloc)	säurelabilen Gruppen (z. B. Far, Boc), baselabilen Gruppen (z. B. Fmoc, Pal), edelmetallablen Gruppen (z. B. Aloc)
Linker ist orthogonal zu:	Säure	Base, Edelmetall	Säure, Base, Edelmetall	Säure, Base, Edelmetall
Nachteile	<i>N</i> -Boc-Chemie lässt Einführung nur einer Prenylgruppe am N-Terminus des Peptids zu	keine Einführung C-terminaler funktioneller Gruppen, außer bei Verknüpfung über eine Aminosäureseitenkette	Linker ist unter nucleophilen aeren Bedingungen anfällig für Spaltung; Peptidverlust während der Spaltung; Amine müssen während der Spaltung geschützt werden	Beladung nicht optimal; Amine müssen während der Spaltung geschützt werden.

basischen Domäne an einem Trityl-Anker. Die Aminosäure, die über ihre Seitenkette an das Harz gebunden wird, ist vorzugsweise nahe am C-Terminus des Peptids lokalisiert. Auf diese Weise werden störende Blockkondensationen am festen Träger und damit die Gefahr der Racemisierung vermieden. Das C-terminal farnesylierte oder geranylgeranierte Cystein des Ras-Peptids wird dann durch Kupplung eines prälipidierten Cysteins an die selektiv entschützte Carboxyfunktion des verankerten Lysins eingeführt. Nach der Bildung des harzgebundenen Dipeptids können die weiteren Syntheseschritte in Richtung des N-Terminus unter Verwendung von Standardverfahren und z.B. einer Fmoc/Aloc-Strategie ausgeführt werden. Die Aloc-geschützten Seitenketten von Lysin und Arginin können am festen Träger durch Spaltung mit Palladium(0) und einem geeigneten Nucleophil freigesetzt werden. Durch Behandeln des Harzes mit nur 1% TFA und einem Abfangreagens (scavenger) werden anschließend die Peptide abgelöst, wobei die Prenylgruppe intakt bleibt. Ein Beispiel für die Synthese eines solchen prenylierten Peptids mit mehreren basischen Seitenketten an einem Trityl-Linker ist in Schema 5 dargestellt.^[48]

Zusammengefasst zeichnet sich ein Trityl-Anker durch zwei Merkmale aus: 1) Er ist orthogonal zu Prenylgruppen,



Schema 5. Festphasensynthese eines D-Ral-Lipopeptids auf Tritylharz:
a) $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$, PhSiH_3 , THF; b) $\text{H}_2\text{N}-\text{Cys}(\text{GerGer})-\text{OMe}$, PyBop, NMM, CH_2Cl_2 ; c) 1. Fmoc-AA-OH , HATU, HOAt, DIPEA, DMF 2. Piperidin/DMF (1:4); d) $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$, DMF/Piperidin (1:4); e) TFA (1%), TES (2%) in CH_2Cl_2 .

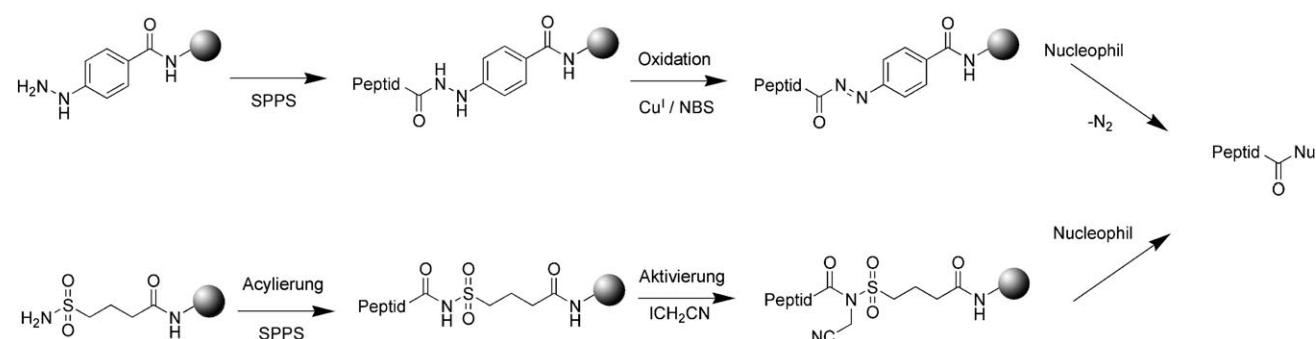
einschließlich der Geranylgeranylgruppe; 2) er lässt die Einführung funktioneller Gruppen sowohl in der Sequenz als auch am C-Terminus zu. Eine entscheidende Voraussetzung für die Verwendung des Trityl-Linkers nach der oben beschriebenen Methode ist das Vorhandensein einer Ankergruppe im C-terminalen Teil der Peptidsequenz, die anschließend mit nur 1% TFA vom Harz abgespalten werden kann (es hat sich erwiesen, dass 1% TFA ausreichend verdünnt ist, damit keine Isomerisierung von Doppelbindungen auftritt, auch nicht bei Geranylgeranylgruppen).

Eine weitere Einschränkung der Methode besteht darin, dass sie mit Thioestern wie dem palmitoylierten Cystein unverträglich ist. Es ist nicht möglich, die Aloc-Gruppen mit Piperidin als Abfangreagens zu entschützen, da die Thioester gegen Nucleophile labil sind. Eine Lösung könnte in der Optimierung des Nucleophils bestehen, es ist aber zu bedenken, dass die Entschützung einer großen Zahl von Aloc-Gruppen am festen Träger oft keine triviale Aufgabe ist. Außerdem hat sich gezeigt, dass die Entschützung der Aloc-Gruppen mit der Maleimidgruppe nicht verträglich ist, weil Triphenylphosphoran, das als Ligand für den Palladiumkatalysator verwendet wird, das Maleimid nucleophil angreift.

Die Kombination Trityl-Linker/Aloc-Schutzgruppe hat sich als die beste Lösung für die Synthese mehrbasischer Sequenzen erwiesen, und die Methode ist deutlich effizienter als andere Linkerstrategien.^[47,48]

2.3.1.3. Hydrazid-Linker

Wie oben geschildert, eignet sich der Trityl-Linker zur Festphasensynthese verschiedenartiger Ras-Peptide, allerdings können damit nicht alle Peptidarten der Ras-Superfamilie synthetisiert werden. Um weitere Spezies zugänglich zu machen, wurde der Arylhydrazid-Linker für die Synthese lipiderter Peptide erforscht. Diese oxidationsempfindliche Gruppe ist schon seit über 30 Jahren bekannt.^[49] Als Linker ist die Arylhydrazidgruppe zur Bildung von kleinen Peptidestern und -amiden^[50,51] sowie cyclischen Peptiden verwendet worden.^[52] Zur Spaltung wird der Linker zunächst zum Acyldiazien oxidiert, das dann von einem geeigneten Nucleophil angegriffen wird (Schema 6). Die beiden am häufigsten verwendeten Methoden sind eine In-situ-Methode mit $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, O_2 und einem Nucleophil und eine Methode, bei der der Linker zunächst mit *N*-Bromsuccinimid oxidiert und



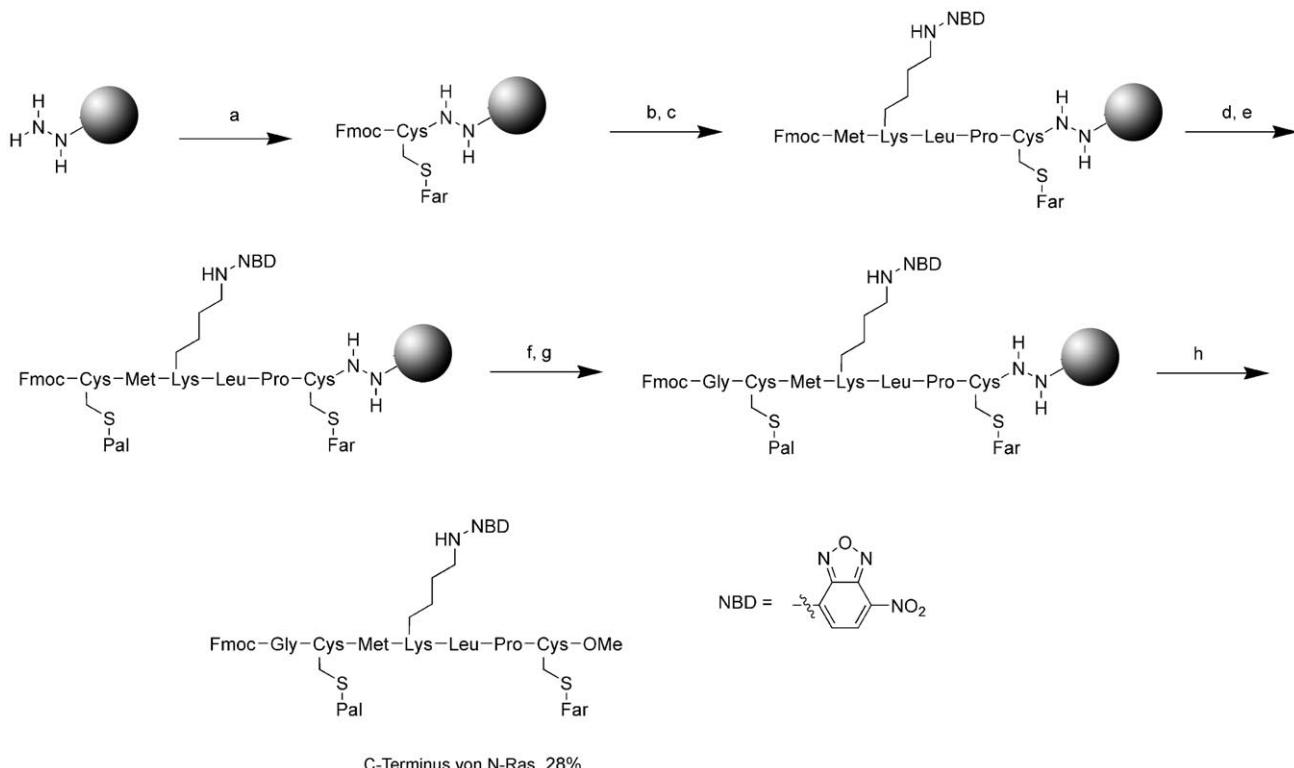
Schema 6. Übersicht zur Verwendung des Arylhydrazid- (oben) und des Ellman-Sulfonamid-Linkers (unten) in Peptidsynthesen. Zur Spaltung mit einem Nucleophil wird der Hydrazid-Linker durch Oxidation und der Sulfonamid-Linker durch *N*-Alkylierung aktiviert.

in einem zweiten Schritt mit einem Nucleophil abgespalten wird. Der Linker ist orthogonal zu den klassischen Urethanschutzgruppen wie Boc, Fmoc und Aloc, und die Abspaltung verläuft ohne Racemisierung. Typische Nucleophile, die zur Abspaltung verwendet werden können, sind Amine, Wasser und Alkohole.^[53] Wegen der Oxidationsempfindlichkeit des Linkers müssen die Kupplungsreaktionen und besonders die Fmoc-Entschützung unter Sauerstoffausschluss durchgeführt werden.

Der Hydrazid-Linker ist schon früher in der Peptidsynthese eingesetzt worden, seine besondere Eignung zeigte sich aber erst bei der Synthese lipiderter Peptide.^[54–58] Eine typische Peptidsequenz, die am Hydrazid-Linker synthetisiert wurde, ist in Schema 7 gezeigt. Das Zielpeptid enthält eine Farnesylgruppe, einen Palmitoylthioester und einen Fluorophor, der an eine Lysin-Seitenkette gebunden ist, sowie einen C-terminalen Methylester. Die Kupplungsbedingungen für die Aminosäuren ähneln denen üblicher Festphasenpeptidsynthesen mit anderen Linkern. Allerdings wurde im vorliegenden Fall eine wichtige Vorsichtsmaßnahme getroffen, um eine *S,N*-Acylverschiebung der Palmitoylgruppe nach der Fmoc-Entschützung des palmitoylierten Cysteins zu verhindern. Man fand heraus, dass die *S*-palmitoylierten Peptide stabil blieben, wenn die Fmoc-Gruppe mit einer Lösung von 1% DBU in DMF in 2 × 30 Sekunden entschützt wurde. Die nächste Kupplung wurde dann unmittelbar darauf mit präaktivierter Aminosäure und HATU als Kupplungsreagens vorgenommen.^[56]

Mit ähnlichen Ansätzen wurden viele verschiedene Peptide am Hydrazid-Linker synthetisiert, darunter solche, die Farnesyl-, Geranylgeranyl-, fluoreszenzmarkierte Geranyl- und Palmitoyllipide enthalten. Es wurden Fluoreszenzmarker wie Nitrobenzoxadiazol und photoaktivierbare Gruppen wie die Benzophenongruppe eingeführt, und Peptide der Ras-Superfamilie mit C-terminalen Säure-, Ester- oder Amidgruppen wurden vom Harz abgespalten.

Ein orthogonaler Linker mildert nicht das Problem, dass man die funktionellen Gruppen der Aminosäureseitenketten mit Schutzgruppen versehen muss. Dies gilt im Allgemeinen auch bei der Peptidsynthese am Hydrazid-Linker. Hier wurden Schutzgruppen verwendet, die entweder stark säurelabil sind (z.B. die Tritylgruppe für Alkohole) oder baseabil (z.B. die 9-Fluorenylmethylestergruppe für Carbonsäuren) oder edelmetallabil (z.B. die Aloc-Gruppe für Amine). Diese Schutzgruppen können vom Peptid entfernt werden während es sich noch am Harz befindet. Allerdings werden Amine vorzugsweise nicht vor der Abspaltung entschützt, da ihr nucleophiler Charakter zur Bildung von Nebenprodukten führen kann; die freigesetzten Amine greifen den oxidierten Linker an und spalten das Peptid, wodurch cyclische Peptide oder Oligomere entstehen. Die sterisch anspruchsvolleren und weniger nucleophilen Alkoholgruppen z.B. der Serin-Seitenkette sind in dieser Hinsicht weitaus unproblematischer und können gewöhnlich am Harz entschützt werden. Dass das Peptid nach der Abspaltung vom Harz noch geschützte Amingruppen enthält, schränkt etwas die Flexibilität der



Schema 7. Festphasensynthese eines N-Ras-Lipopeptids an Hydrazidharz: a) Fmoc-Cys(Far)-OH, HBTU, HOEt, TMP, CH₂Cl₂/DMF (1:1); b) Pipеридин/DMF (1:4); c) Fmoc-AA-OH, HBTU, HOEt, DIPEA, DMF; d) Piperidin/DMF (1:4); e) Fmoc-Cys(Pal)-OH, HBTU, HOEt, TMP, CH₂Cl₂/DMF (1:1); f) DBU (1 %) in DMF; g) Fmoc-Gly-OH, HATU (5 Äquiv.), DIPEA (20 Äquiv.) CH₂Cl₂/DMF (7:1); h) Cu(OAc)₂ (0.5 Äquiv.), Pyridin (30 Äquiv.), Essigsäure (50 Äquiv.), Methanol (215 Äquiv.), CH₂Cl₂, O₂.

Synthese ein, da nun ein zusätzlicher Entschützungsschritt in Lösung erforderlich ist.

Während der Entwicklung dieser Festphasensynthesen wurde beobachtet, dass nach der oxidativen Abspaltung der Hydrazid-Linker geringe Anteile der synthetisierten Lipopeptide durch eine nicht identifizierte Verknüpfung am festen Träger gebunden blieben und weder oxidativ noch unter sauren oder basischen Bedingungen abgespalten werden konnten. Da die oxidative Spaltung des Hydrazid-Linkers höchstwahrscheinlich über ein intermediäres Acylradikal verläuft, könnte es sein, dass dieses Radikal eine kovalente Bindung mit dem polymeren Träger eingeht.^[59,60]

2.1.3.4. Ellman-Sulfonamid-Linker

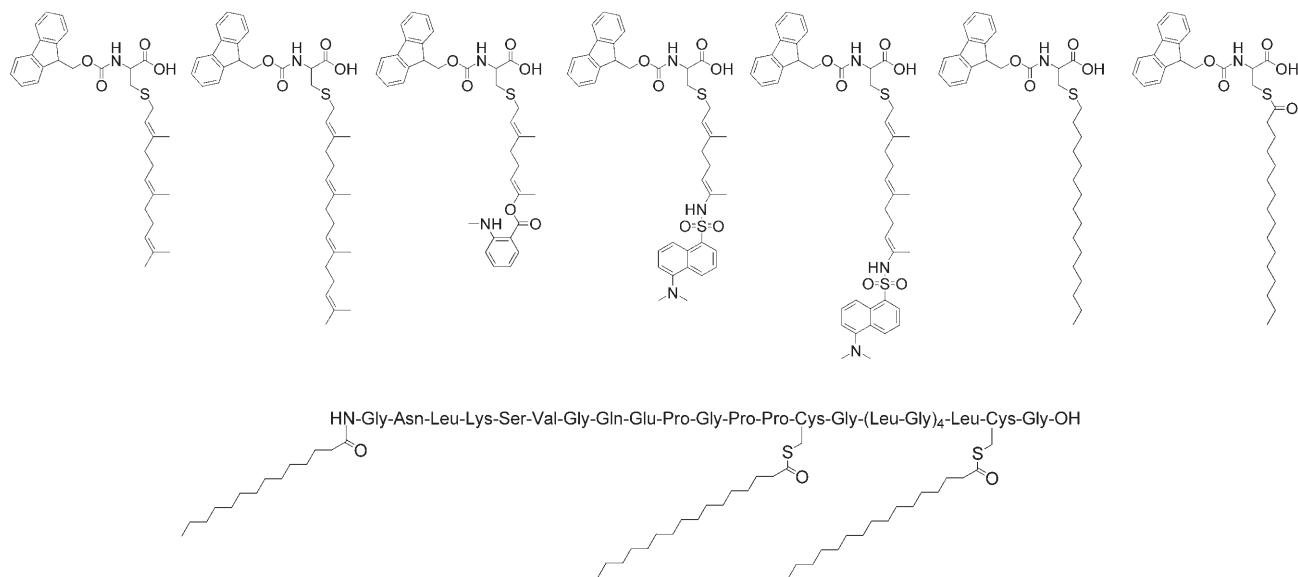
Der Ellman-Sulfonamid-Linker wird durch Alkylierung aktiviert (ist aber dennoch orthogonal zum Methioninethioether) und setzt die Zielverbindungen nach Angriff eines Nucleophils frei.^[61] Gegenüber Säuren und Basen ist er stabil. Da diese Merkmale orthogonal zu den lipidierten Peptiden der Ras-Superfamilie sind, war es naheliegend, diesen Linker für die Synthese solcher Peptide zu testen.^[62] Die ersten Studien haben gezeigt, dass der Ellman-Sulfonamid-Linker tatsächlich ein wertvolles Reagens zur Synthese von Lipopeptiden ist, und er scheint sogar den Hydrazid-Linker zu übertreffen, indem er die Synthese von Peptiden mit mehr als 20 Aminosäuren und mehrfachen Lipideinheiten ermöglicht. Als Beleg dient die Synthese eines Hexacosapeptids, das sich von der NO-Synthase ableitet (Schema 8, untere Strukturformel). Weitere Studien zur allgemeinen Anwendbarkeit dieses Linkers sind derzeit im Gange (siehe auch Tabelle 1).

Der PTMSEL-Linker ((2-Phenyl-2-trimethylsilyl)ethyl), der sich mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) spalten lässt, wurde erst vor kurzem im Zusammenhang mit der Synthese lipidierter Peptide untersucht.^[63] Dieser Linker er-

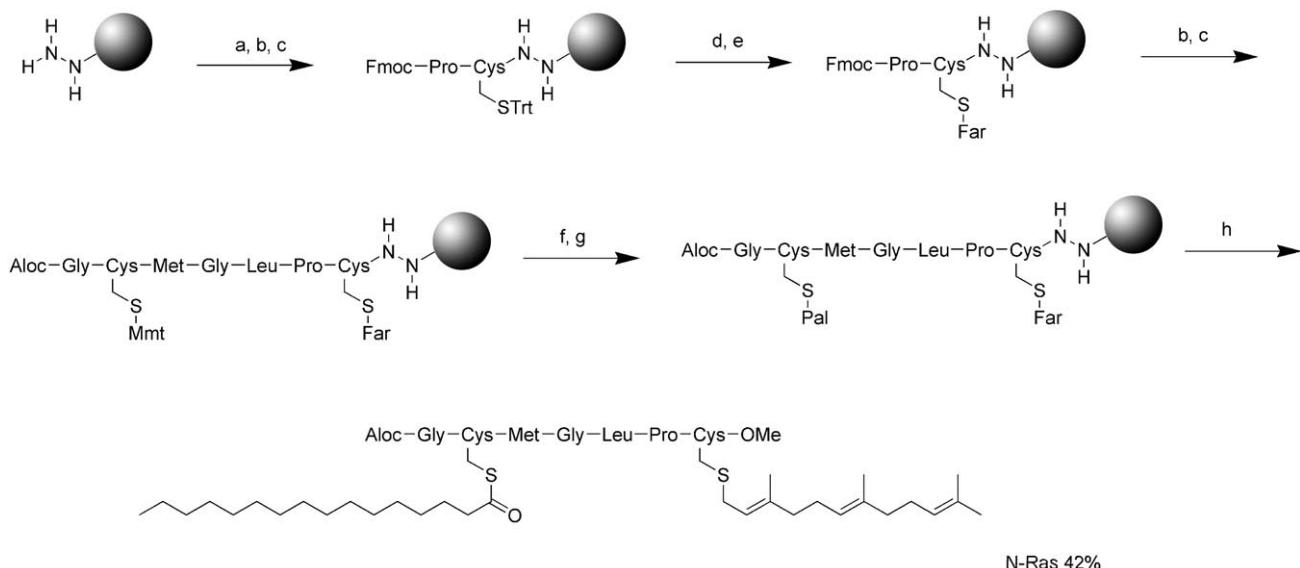
möglicht zwar nur die Synthese C-terminaler Carbonsäurederivate, seine Spaltungsbedingungen sind aber völlig orthogonal zu den Lipidgruppen.

2.3.2. Einführung der Lipidgruppen

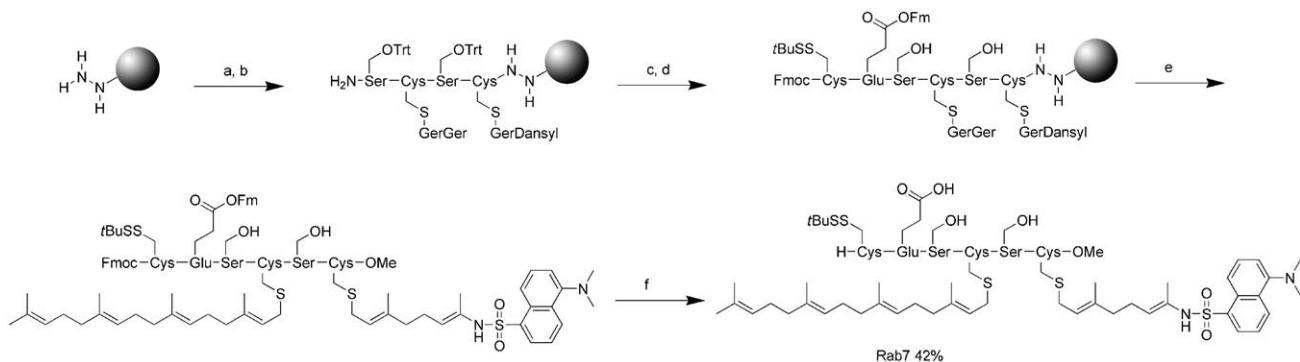
Es gibt – unabhängig von Fest- oder Lösungsphasenchemie – zwei grundlegende Methoden, um Lipidgruppen in ein Peptid einzuführen: entweder durch Kupplung prälipidierter Aminosäuren oder durch Lipidierung eines selektiv entschützten Peptids, d.h. eines Peptids mit einer freien Thiolgruppe. Beide Methoden, die Lipidierung am Harz^[54,55,64–71] und die Verwendung prälipidierter Bausteine,^[56,57] wurden zur Synthese lipidierter Peptide an festen Trägern untersucht. Die erste Methode wurde gewählt, um C-terminale Ras-GTPase-Peptide aufzubauen. Ein Beispiel ist in Schema 9 gezeigt. Mit einer orthogonalen Schutzgruppenstrategie konnten hierbei eine Farnesyl- und eine Palmitoylgruppe schrittweise an der Peptidkette angebracht werden.^[54,55] Die Methode benötigt einen großen Lipidüberschuss, was problematisch wird, wenn die Lipidgruppen z.B. in modifizierter Form synthetisiert werden müssen, und sie erfordert eine komplexe Schutzgruppenstrategie. Daher könnte es schwierig werden, mehrere Lipidgruppen des gleichen Verknüpfungstyps, beispielsweise eine Geranylgeranylgruppe und eine Farnesyldansylgruppe, einzuführen. Eine mögliche Lösung für dieses Problems bietet eine kürzlich entwickelte, reverse Methode der S-Farnesylierung und S-Palmitoylierung.^[72] Hierbei wurden die Lipidgruppen durch eine S_N2-Substitution von Bromid eingeführt, wobei eine nucleophile Thiolgruppe des Lipids mit einer elektrophilen Bromalaningeruppe des Peptids in Lösung reagierte. Eine andere Methode, um Prenylthioether in das Peptid einzuführen, ist die chemoselektive konjugierte Addition eines nucleophilen Thiolats (z.B. Farnesylthiolat) an ein Dehydroalanin.^[73] Das Problem



Schema 8. Oben: lipidierte Cystein-Bausteine für Festphasensynthesen: Fmoc-Cys(Far)-OH, Fmoc-Cys(GerGer)-OH, Fmoc-Cys(GerMant)-OH, Fmoc-Cys(GerDansyl)-OH, Fmoc-Cys(FarDansyl)-OH, Fmoc-Cys(HD)-OH, Fmoc-Cys(Pal)-OH. Unten: ein von der NO-Synthase abgeleitetes Hexacosapeptid, das aus prälipidierten Bausteinen synthetisiert wurde.



Schema 9. Synthese eines N-Ras-Lipopeptids durch Lipidierung des harzgebundenen Peptids („on-resin lipidation“):^[54] a) Fmoc-Cys(Trt)-OH, DIC, HOBt, DMF; b) Piperidin/DMF (1:1); c) Fmoc-AA-OH, HBTU, HOBt, DIEA, DMF; d) 50% TFA, TES, CH_2Cl_2 ; e) Far-Br, DIEA, DMF; f) 1% TFA, TES, CH_2Cl_2 ; g) Pal-Cl, HOBr, Et_3N , CH_2Cl_2 , DMF; h) $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, Essigsäure, Pyridin, O_2 , CH_2Cl_2 , MeOH.



Schema 10. Synthese eines Rab7-Lipopeptids durch Verwendung lipidierter Bausteine:^[57] a) Fmoc-AA-OH, DIC, HOBt, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ (1:1); b) Piperidin/DMF (1:2); c) Fmoc-Cys(SSBu)-Glu(OFm)-OH, DIC, HOBt, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ (1:1); d) 1% TFA, 2% TES, CH_2Cl_2 ; e) $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, Pyridin, O_2 , CH_2Cl_2 , MeOH; f) Et_2NH , CH_2Cl_2 .

der fehlenden stereoselektiven Kontrolle bei dieser konjugierten Addition wurde durch die Verwendung von Aziridin-2-carbonsäure enthaltenden Peptiden gelöst.^[74] Diese nichtproteinogene Aminosäure ermöglichte die regio- und stereoselektive Konjugation mit einer Reihe von nucleophilen Thiolgruppen in Lösung und am festen Träger. Diese neu entwickelten Methoden zum Einbau lipidierter Aminosäuren könnten sich bei zukünftigen Synthesen von Peptiden der Ras-Superfamilie als nützlich erweisen.

Eine weitere Methode zur Synthese lipidierter Peptide beruht auf der Verwendung prälipidierter Cystein-Bausteine. Dieser Ansatz umgeht Probleme, die mit der Prenylierung am Harz einhergehen. Die prälipidierten Bausteine (Schema 8, oben) können in der Kupplungssequenz wie normale Aminosäuren behandelt werden und lassen sich überall in die Sequenz einbauen, ohne dass man die Schutzgruppenstrategie ändern müsste. Damit steht eine hoch flexible und allgemeine Methode zur Verfügung, die auf andere Arten prenylierter Peptide übertragbar ist. Ein Beispiel für diese Strategie

ist in Schema 10 gezeigt.^[57] Zwei unterschiedliche Prenylgruppen konnten unter Verwendung von prenylierten Cysteinen in die Rab7-Peptide eingeführt werden. Um eine Racemisierung bei der Kupplung dieser Cysteine zu verhindern, wurden Methoden eingesetzt, die weder basische Bedingungen noch polare Lösungsmittel erfordern.

2.4. Schlussfolgerungen zur Peptidsynthese

Viele der hier aufgeführten Peptide sind sowohl in Lösung als auch durch Festphasensynthesen hergestellt worden, sodass ein guter Vergleich beider Strategien möglich ist. Die maßgeblichen Unterschiede zwischen der Lösungs- und der Festphasensynthese lipidierter Peptide der Ras-Superfamilie sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Hinsichtlich Effizienz und Flexibilität ist die Festphasenmethode in der Mehrzahl der Fälle einer Synthese in Lösung überlegen. Sie liefert reinere Peptide innerhalb kürzerer Zeit und mit höheren Gesamt-

Tabelle 2: Vergleich von Lösungs- und Festphasensynthesen lipidierter Peptide der Ras-Superfamilie.

	Synthese in Lösung	Festphasensynthese
Reinigung	Reinigung jeder einzelnen Zwischenstufe erforderlich, niedrigere Gesamtausbeuten	Reinigung nur des Endprodukts erforderlich (durch präparative Chromatographie)
Ausbeuten zweifach lipidierter Hexamere	einzelne Kupplungsschritte haben mittlere bis gute Ausbeuten, Gesamtausbeuten 7–8%	einzelne Kupplungen mit fast vollständigem Umsatz, Gesamtausbeuten 40–50%
Bausteinsynthese	ja	ja
Dauer der Peptidsynthese (je nach Sequenz)	Wochen	Tags
kombinatorische Aspekte	nicht zur Synthese von Verbindlungsbibliotheken geeignet, da Verbindungen oft eigene Synthesestrategien erfordern	Synthese von Verbindlungsbibliotheken möglich, abhängig vom Divergenzpunkt; mäßiger Syntheseaufwand
Kostenfaktoren	Geranylgeranylgruppen, geringe Ausbeuten	Harz und prälipidierte Cystein-Bausteine

ausbeuten. Bei der Auswahl des Linkers für die Festphasensynthese müssen die Sequenz und die Eigenschaften des Peptids berücksichtigt werden. Der Hydrazid-Linker und der Ellman-Sulfonamid-Linker sind die am vielseitigsten verwendbaren Linker, die gegenwärtig zur Verfügung stehen.

Verschiedenartige C-Terminali von GTPasen aus der Ras-Familie, einschließlich der H-, K-, N-Ras-, Rab7- und RhoA-Peptide, wurden durch Festphasensynthesen synthetisiert. Die allgemeine Methode ist auch auf andere Arten lipidierter Peptide anwendbar, und eine Sequenz von zehn Aminosäuren ist gewöhnlich ohne Weiteres in Milligrammmengen zugänglich. Es können auch längere Peptide erhalten werden, wie die Synthese des dreifach lipidierten Hexacosapeptids der endothelialen NO-Synthase (ein 26mer) beweist.^[62] Darüber hinaus können funktionelle Gruppen wie Fluorophore, photoaktive Linker und Gruppen zur Thiolkonjugation eingebaut werden. Die Festphasenmethoden sind zuverlässig und liefern funktionelle Peptide im Zeitrahmen von 1 bis 2 Wochen, inklusive Reinigung.

Die entwickelten Festphasensynthesemethoden können nun dazu dienen, andere lipidierte Peptide herzustellen: Peptide mit nichtnatürlichen Aminosäuren oder D-Aminosäuren oder Peptide, die mit anderen, auch biologisch relevanten Lipidgruppen ausgestattet sind. Der Austausch von Palmitoyl gegen andere Fettsäuren ist biologisch relevant^[75] und konnte bei Proteinen der Ras-Familie verwendet werden, um ihren Einfluss auf Protein-Protein- und Protein-Lipid-Wechselwirkungen zu untersuchen. Ähnlich wie bei den diskutierten Lipopeptiden mit Prenylgruppen, die z.B. mit Fluorophoren modifiziert sind, konnten Fettsäuren wie Oleat und Arachidonat anstelle der Palmitoylgruppe eingeführt werden. Die entwickelten Reaktionen lassen sich universell auf diese funktionellen Fettsäuren anwenden und sollten ohne Nebenreaktionen ablaufen.

3. Synthese lipidierter Ras- und Rab-Proteine

3.1. Synthese durch biologische Methoden und ihre Grenzen

Die Herstellung rekombinanter Proteine ist eine Schlüsseltechnologie in den Biowissenschaften. Allerdings gelang es bei posttranslational modifizierten Proteinen nur mühsam, Fortschritte in der Synthese authentischer oder modifizierter Polypeptide zu erzielen. Dies ist in erster Linie auf die Komplexität der Proteinmodifizierungswege und den Mangel an Methoden zu ihrer Manipulation zurückzuführen.^[76]

Posttranskriptionale Modifizierungen wie Phosphorylierung, Glycosylierung, Isoprenylierung und Acylierung sind typisch für eukaryotische Organismen. In Prokaryoten wie *E. coli* kommen solche Modifizierungen nicht vor (wenn-gleich *E.-coli*-Stämme erzeugt wurden, die Enzyme wie die *N*-Myristoyl-Transferase exprimieren).^[77] Aus diesem Grund wird die Synthese posttranskriptional modifizierter Proteine häufig in eukaryotischen Expressionssystemen ausgeführt.^[78–80] Diese sind jedoch in der Handhabung gewöhnlich sehr kosten- und arbeitsintensiv, z.B. in der Produktreinigung, und liefern geringe Ausbeuten. Die Situation wird noch komplizierter, wenn das Protein an mehreren Stellen lipid-modifiziert ist.^[81] Besonders schwierig wird es, wenn die gewünschten funktionellen Gruppen mit einem hohen Grad an Regiokontrolle an spezifischen Stellen in ein Protein eingebracht werden müssen, z.B. in der Nähe eines aktiven Zentrums oder an einer Kontaktfläche für die Wechselwirkung mit Partnermolekülen. Hintergrund dieser Probleme ist letztlich, dass die ansonsten leistungsfähigen Methoden der organischen Chemie auf so große und verschiedenartig reaktive Moleküle wie Proteine nicht angewendet werden können. Noch schwieriger wird die Situation, wenn die interessierenden Proteine posttranskriptionale Modifikationen durchlaufen, die mit den gewünschten Proteinmanipulationen oder Verfahrenstechniken unverträglich sind. In diesem Fall wären die modifizierten Proteine für ihren natürlichen Modifizierungs-pfad nicht mehr erkennbar. All diese offenkundig nichtorthogonalen Modifikationen betreffen die synthetisch erzeugten Proteine der Ras-GTPase-Superfamilie.

Für Untersuchungen von Proteinen der Ras-Superfamilie werden Methoden benötigt, die präparative Mengen an lipidierten Proteinen mit sowohl natürlichen als auch neuartigen Funktionen wie Fluoreszenz, Photoreaktivität, Spinmarkierungen oder Lipidgruppen an nichtnatürlichen Positionen liefern. Die kürzlich entwickelten Proteinligationsmethoden ermöglichen die Verknüpfung großer rekombinanter Proteingerüste mit Peptiden, die durch organische Synthese hergestellt wurden.^[82–86]

3.2. Synthese durch Proteinligationsmethoden

Die Fortschritte auf dem Gebiet der Proteinligation führten zu einem breiten Spektrum an Methoden für die semisynthetische Herstellung posttranslational modifizierter Proteine. Diese Methoden liefern entweder native Bindungen (z.B. durch Thioleinfangreaktion, native chemische Ligation und Ligation exprimierter Proteine) oder nichtnative Bindungen (z.B. durch Imineinfangligation, Oximligation und Maleimidocapronsäureligation). Diese Verknüpfung von organischer Chemie und molekularer Biologie eröffnet einen Zugang zu modifizierten Proteinen (einschließlich natürlicher und nichtnatürlicher Modifikationen), die durch andere, z.B. enzymatische Verfahren im Allgemeinen nicht zugänglich sind.^[18]

Es existieren mehrere Methoden, um modifizierte Lipide und Lipopeptide in Proteine einzuführen; drei wichtige wurden bei Ras-GTPasen angewendet (Schema 11). Eine Methode beruht auf der In-vitro-Anbindung der modifizierten Prenylgruppen unter Verwendung von Prenyltransferasen (Schema 11 C).^[87,88] Bei diesem Verfahren, mit dem Ras-^[89,90] und Rab-Proteine^[91,92] modifiziert worden sind, wird das Protein mit allen Aminosäuren exprimiert, und nur die Prenylgruppen werden in einer späteren Stufe eingeführt. Dabei ist es möglich, auch nichtnatürliche Prenylanaloga einzubauen. Isoprenoidanaloga haben sich als vielseitig verwendbare Reagenzien zur Erforschung des Mechanismus und der Struktur von Prenyltransferasen erwiesen. Man hat fluoreszierende oder photoaktive Gruppen in die Prenyleinheit

eingebaut, und auch der Einfluss von kleineren sterischen Hinderungen auf die Bindung zu Phenyltransferasen und deren Funktionsfähigkeit wurde untersucht.^[87,93–107] Für Proteomics-Strategien bieten insbesondere Azid-tragende Farnesylgruppen einen vielversprechenden Ansatz.^[108]

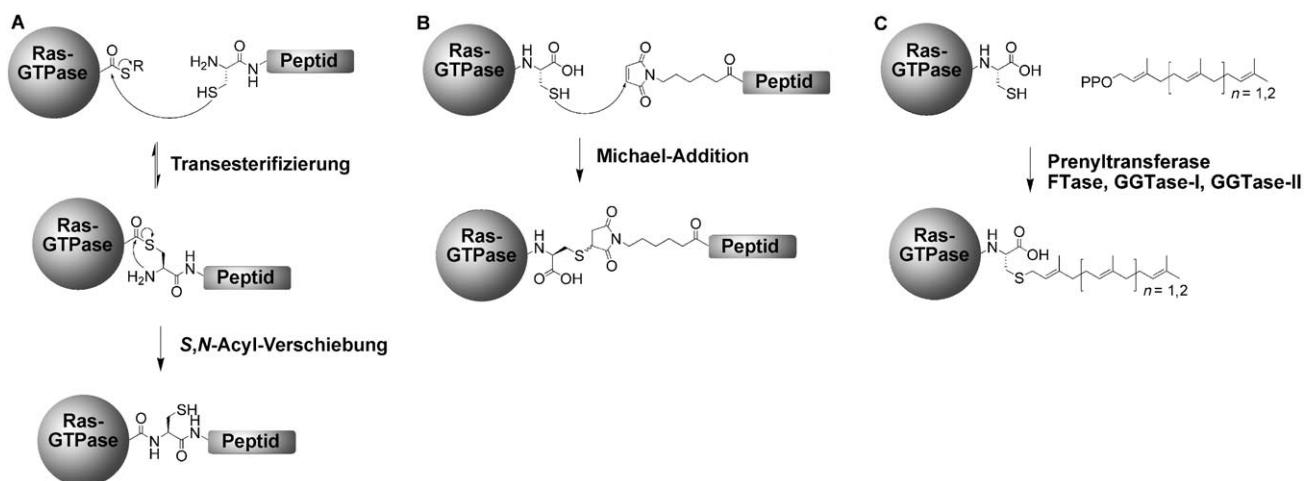
Eine zweite Methode zur Einführung synthetischer Lipopeptide ist die Maleimidocaproyl(MIC)-gesteuerte Ligation (Schema 11 B).^[109] Dieses Verfahren erfordert eine leicht zugängliche, z.B. C-terminale freie Thiogruppe am Protein (normalerweise von einem Cystein stammend), um das N-terminal MIC-modifizierte Peptid anzubinden. Bei der dritten Methode, der Ligation exprimierter Proteine (EPL),^[110,111] wird ein lipidiertes Peptid an einem N-terminalen Cystein über eine native Peptidbindung mit dem C-Terminus einer Thioester-markierten Ras-GTPase verknüpft (Schema 11 A).

Jedes dieser Ligationsverfahren hat seine typischen Merkmale, die in Tabelle 3 zusammengefasst sind. In den folgenden Abschnitten werden Beispiele für die Synthese der Ras-GTPase durch MIC-Ligation (für N-Ras) und durch EPL (für Rab) vorgestellt.

3.2.1. Ligation exprimierter Rab-Proteine

Rab-Proteine enthalten in voller Länge ungefähr 210 Aminosäuren, wobei die Prenylgruppen-tragenden Cysteine innerhalb der letzten vier C-terminalen Aminosäuren lokalisiert sind.^[112] Rab-Proteine, einschließlich ihrer C-terminal verkürzten Formen, können ohne posttranskriptionale Modifikationen in *E. coli* exprimiert werden. Mit diesem Expressionssystem gelingt es auch, Rab-Proteine als Fusionat mit einem modifizierten Intein zu exprimieren, an das sich eine Chitinbindungsdomäne (CBD) anschließt. Auf diese Weise lassen sich die C-terminalen Thioester der gekürzten Rab-Proteine reinigen und abtrennen.^[113]

Gewöhnlich sind die mit organischen Synthesemethoden hergestellten prenylierten C-terminalen Rab-Peptide wegen ihrer apolaren Lipidmodifikationen in wässrigen Medien nur wenig löslich. Die Ligation von Lipopeptiden mit N-terminalen Cystein am Rab-Protein wurde zuerst mithilfe eines



Schema 11. Methoden, die zur Einführung des natürlichen und des modifizierten lipidierten C-Terminus bei Ras-GTPasen eingesetzt wurden:
A) Ligation exprimierter Proteine (EPL, „expressed protein ligation“), B) Maleimidocaproyl(MIC)-Ligation, C) Prenylierung mit Prenyltransferasen.

Tabelle 3: Vergleich der Proteinsynthesemethoden, die zur Synthese von Ras-GTPasen verwendet werden.

Methode	Merkmale	Voraussetzungen	Anwendung
Ligation exprimierter Proteine	native Peptidbindung; freie Thiolgruppe an der Verknüpfungsstelle im Endprodukt	Protein/Peptid mit C-terminalem Thioester; Peptid/Protein mit N-terminalen Cysteinen	Rab1, Rab7, K-Ras
Maleimid-Ligation	nichtnatürliche Thioetherbindung; freie Carbonsäure an der Verknüpfungsstelle im Endprodukt; Selektivitätsprobleme	Protein mit C-terminalen Cysteinen; Peptid mit N-terminalem Maleimid; nur ein einziges leicht zugängliches Cystein darf vorliegen	H-Ras, N-Ras
In-vitro-Prenylierung	begrenzter Zugang zu Proteinen mit anderen funktionellen Gruppen; modifizierte Prenyldonoren möglich	Protein mit CAAX-Box (FTase/GGTase-I) oder mit doppeltem Cysteinmotiv (GGTase-II); zusätzlicher Proteinfaktor (z.B. REP); Processing-Enzyme (aaX-Protease, Carboxymethyltransferase)	Rab7, H-Ras

Ligationstests erforscht.^[114] Bei Studien mit dem am C-Terminus Thioester-markierten Rab7ΔC6 und dem Testpeptid CK(Dansyl)C(GG)-OMe wurde gefunden, dass die ansonsten robuste native chemische Ligation im herkömmlichen Puffersystem versagt. Um die Löslichkeit der Peptide zu verbessern, wurde eine große Auswahl an Detergentien getestet; wie es scheint, vermittelt Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) die Prenylierung am besten.

Um präparative Mengen fluoreszierender Rab7-Proteine zu erzeugen, die Geranylgeranyleinheiten an unterschiedlichen Positionen tragen, wurden präparative Ligationsreaktionen *in vitro* ausgeführt.^[57,114–116] Die Reaktionen verlaufen über Nacht und liefern etwa 85 % verknüpftes (ungereinigtes) Rab-Protein. Das Protein fällt nach der Ligation gewöhnlich aus, und die nichtkovalent gebundenen Peptide können durch einfache Extraktion des Ligationsgemisches mit organischen Lösungsmitteln entfernt werden. Das zurückbleibende, unlösliche Pellet, das hauptsächlich das Protein enthält, wurde in 6 M Guanidiniumchlorid gelöst und dann durch schrittweise Verdünnung in CHAPS-haltigem Puffer zurückgefalten. Anschließend wurde REP-1 (Rab escort protein) oder GDI-Protein (GDI = GDP-Dissosziationsinhibitor) zugegeben und der gebildete Komplex durch Dialyse und Gelfiltration weiter gereinigt. Die Methode führt zu nativen, korrekt gefalteten Rab7-GTPasen und liefert unabhängig von der Zahl der konjugierten Prenylgruppen ähnliche Resultate. In Schema 12 sind einige der mit EPL synthetisierten Rab7-Proteine aufgeführt. Die Ligation exprimierter Proteine ist auch eingesetzt worden, um ein K-Ras-Konstrukt zu erhalten.^[48] Für Ras-Proteine ist kein Chaperon verfügbar, um das lipidierte Protein zu solubilisieren. Im Fall von K-Ras trägt jedoch die C-terminale mehrbasische Sequenz zur Solubilisierung des Proteins bei und ermöglicht so dessen Reinigung.

3.2.2. Maleimid-Ligation mit N-Ras-Proteinen

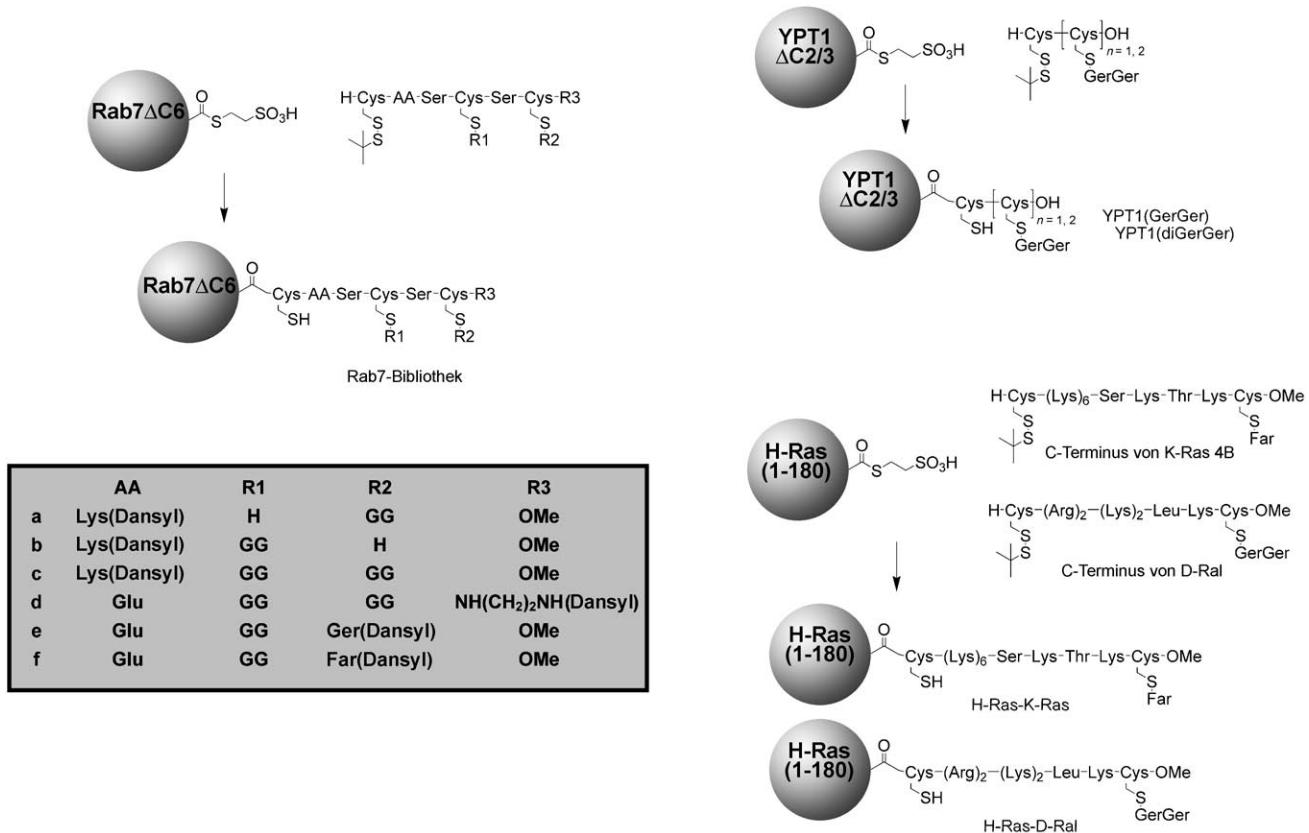
Alle Ras-Isoformen werden am C-terminalen Cystein in der CaaX-Box durch eine cytosolische Farnesylyltransferase prenyliert, anschließend werden die drei letzten Aminosäuren (aaX) abgespalten und das S-farnesylierte Cystein in einen Methylester umgewandelt. Bei den N- und H-Isoformen werden zusätzlich eine oder zwei andere, im C-Terminus lokalisierte Cysteingruppen palmitoyliert. Da diese Modifi-

kationen mit biologischen Verfahren nicht einfach durchzuführen sind, wurden Lipopeptide mit den benötigten funktionellen Gruppen synthetisiert und mit verkürzten Ras-Proteinen am C-Terminus ligiert.^[117,118]

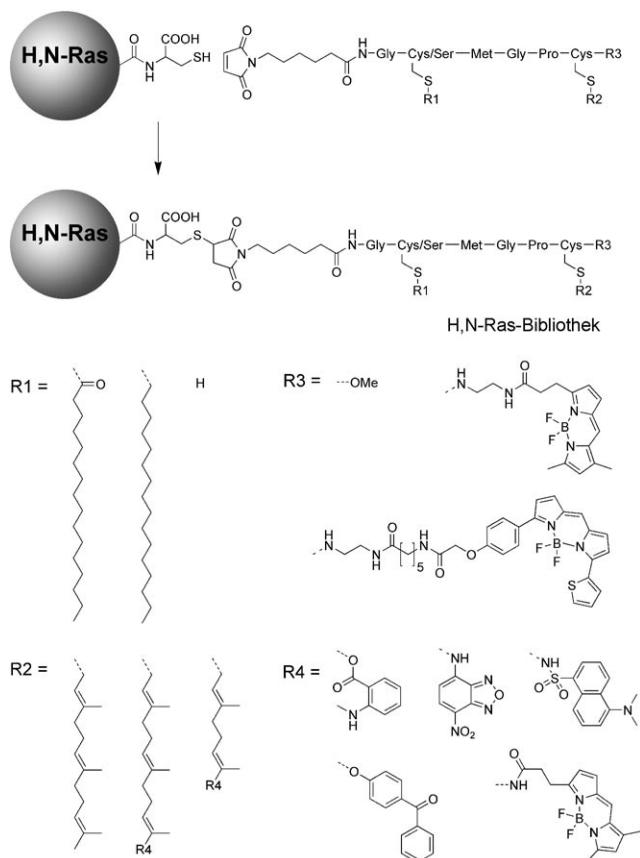
Zu diesem Zweck wurde das Ras-Protein in verkürzte Form mit einem freien C-terminalen Cystein in Bakterien exprimiert, um so eine reaktive Thiolgruppe für die MIC-Ligation bereitzustellen. Wegen der Flexibilität des C-Terminus ist dieses Cystein dem Lösungsmittel stark ausgesetzt, weshalb die Ligation schnell und selektiv verläuft. Weitere Cysteine in der Aminosäuresequenz sind im Proteinkörper vergraben und damit weniger zugänglich, was das Ausmaß an Nebenreaktionen beschränkt.^[119] Das Verhältnis von Peptid zu Protein muss jedoch eingegrenzt werden und sollte 3:1 nicht überschreiten, um zusätzliche MIC-Ligationen zu vermeiden. Zur Reinigung des Neolipoproteins nutzt man die zusätzliche Hydrophobie der eingeführten Lipidgruppen. Durch Extraktion mit einer mit Triton X-114 gesättigten Lösung bei einer Temperatur über 30 °C wurde das ligierte vom unligierten Protein getrennt. Eine Reihe natürlicher und nichtnatürlicher Lipopeptide wurde synthetisiert und zur Herstellung spezifisch funktionalisierter Ras-Proteine verwendet. Außer Prenylgruppen unterschiedlicher Länge und nichthydrolysierbaren Palmitoylanaloga sind auch Fluoreszenzmarker und photoaktivierbare Gruppen eingeführt worden (Schema 13).

3.2.3. Diels-Alder-Ligation

Eine vor kurzem entwickelte Proteinligationsmethode, deren mögliche Anwendung auf Ras-GTPasen nachgewiesen werden konnte, ist die Diels-Alder-Ligation.^[120] Erste Resultate mit Peptiden belegten, dass die Methode auch allgemein anwendbar ist. Mit Ausnahme von Cysteinen mit freien Thiolgruppen wurden alle Aminosäuren toleriert (diese Unverträglichkeit lässt sich gewöhnlich durch temporäres Schützen der freien Thiolgruppen umgehen). Die Diels-Alder-Ligation wurde zur Anbindung eines lipidierten Peptids an Rab7ΔC6 eingesetzt. Über das Bindungsvermögen für REP-1 wurde nachgewiesen, dass die Funktion der GTPase nach Ligation erhalten geblieben war. Diese Ligationsmethode könnte auch verwendet werden, um Proteine auf Glasobjektiven zu immobilisieren.



Schema 12. Synthese von Rab- und Ras-Proteinen durch EPL.



Schema 13. Auswahl semisynthetischer Neo-Ras-Proteine, die durch MIC-Kupplung synthetisiert wurden.

4. Biophysikalische Studien mit lipidierten Peptiden

4.1. Insertion in Modellmembranen

Die Struktur des löslichen Teils des Ras-Proteins (Reste 1–166) wurde durch Röntgenstrukturanalyse^[121,122] und NMR-Spektroskopie in Lösung^[123] aufgeklärt. Hingegen wurden Struktur, Dynamik und Details der Membranassoziation des C-Terminus vor allem mithilfe lipidierter Peptide untersucht. Auf diesem Gebiet sind umfangreiche Studien durchgeführt worden,^[30] um beispielsweise die Membranbindung eines doppelt lipidierten modifizierten Heptapeptids, das den C-Terminus des menschlichen N-Ras-Proteins (Reste 180–186) nachahmt, zu erforschen.^[124–126] Mit verschiedenen biophysikalischen Methoden (ATR-FTIR, quantitative ¹H-MAS-NOESY-Spektroskopie, ²H-Festkörper-NMR-Spektroskopie und Neutronenbeugung) wurde untersucht, wo das Peptidrückgrat und die Seitenketten in der Membran lokalisiert sind, wie ihre dynamische transversale Verteilung aussieht und wie sich die Lipidketten des Peptids in die Phospholipiddoppelschicht der Wirtmembran eingebettet.

Der C-Terminus des menschlichen N-Ras-Proteins enthält zwei Lipidmodifikationen, eine Farnesyl- und eine Palmitoylkette. Um die biophysikalischen Studien zu erleichtern, wurde dieser C-Terminus mit zwei deuterierten Lipidmodifikationen ausgestattet. Ein Modell, das die experimentellen Ergebnisse zur Membranbindung des lipidierten

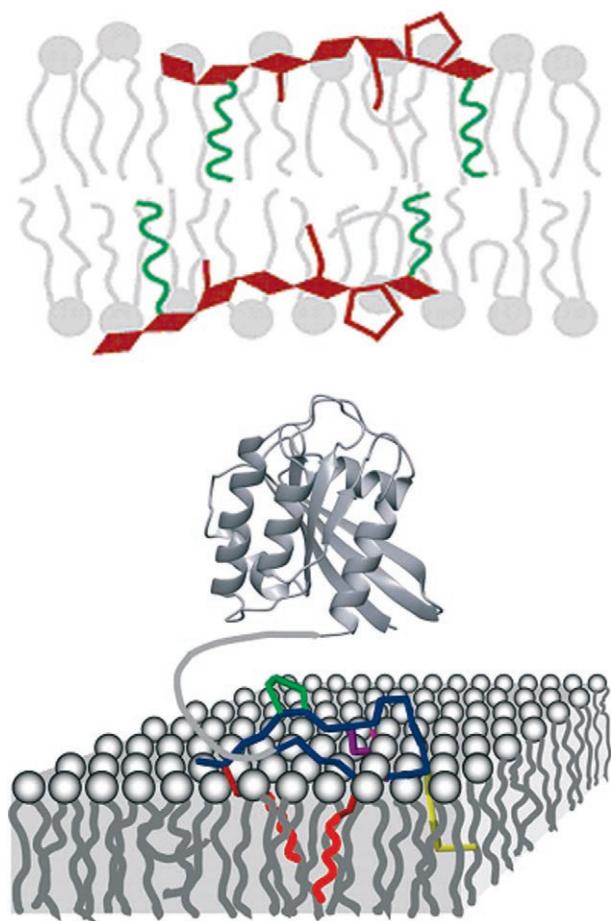


Abbildung 2. Strukturelle Befunde zur Membraninsertion des lipidmodifizierten Ras-Peptids.^[125,127]

Ras-Peptides zusammenfasst, ist in Abbildung 2 gezeigt. Die Polypeptidkette des doppelt lipidmodifizierten N-Ras-Peptids ist an der Lipid-Wasser-Grenzfläche der Membran lokalisiert (im Unterschied zu mehrbasischen lipidierten Peptiden), und es wurden keine Anzeichen für eine definierte Peptidsekundärstruktur gefunden. Die Lipidketten des Peptids schieben sich vollständig in die Phospholipidacylkettenregion und maximieren die hydrophoben Wechselwirkungen. Zusätzlich durchdringen die hydrophoben Aminosäureseitenketten die mittlere Kettenregion und tragen mit ihrer Bindungsenergie zur Minimierung der freien Energie des Lipid-Peptid-Komplexes bei. Daher wird angenommen, dass das Peptid in der Doppelschicht eine flexible Struktur und damit große konformativ Freiheit hat. Folglich wird die Lage der Peptidsegmente durch breite Verteilungsfunktionen parallel zur Membrannormalen beschrieben. Da der C-Terminus des Ras-Proteins unstrukturiert ist, scheint die beschriebene mobile Peptidkonformation für die Struktur des in voller Länge membrangebundenen Ras-Proteins relevant zu sein.

Ein ähnliches Ergebnis wurde für die Bindung des vollständigen lipidierten N-Ras-Proteins an Modellmembranen gefunden.^[127] Die für das Ras-Peptid erhaltenen experimentellen Befunde stimmen ausgezeichnet mit neueren Moleküldynamikstudien überein.^[128] Die Moleküldynamiksimula-

tionen zeigten, dass die Lipidketten des Peptids mobiler sind als die der umgebenden Phospholipide. Zudem ist das Peptidrückgrat auf der Membran über den Simulationszeitraum von 10 ns relativ starr, wobei es allerdings in unterschiedlichen ausgedehnten Konformationen ohne Rückgratwasserstoffbrücken vorliegen kann. In vivo könnten am Mechanismus der Membraninsertion von Ras-Proteinen noch spezifische Farnesyl-Membranrezeptoren beteiligt sein.^[129,130] Als Kandidaten für Farnesyl-vermittelte Membranprozesse kommen Sos,^[131] PI3 K^[132] und PDEδ in Betracht.^[133]

4.2. Bindung an Membransubdomänen

Die Struktur und die laterale Organisation von Lipiden und Proteinen in biologischen Membranen sind Gegenstand intensiver biochemischer und biophysikalischer Forschungen.^[30,134–136] Zentrale Fragen betreffen die Existenz von Membransubdomänen mit unterschiedlicher Lipidzusammensetzung und der Zusammenhang zwischen der Bildung von Lipiddomänen und der Konformation sowie funktionalen Eigenschaften von membranassoziierten Proteinen. Um einige dieser Aspekte im Zusammenhang mit Membraneingebetteten lipidierten Proteinen aufzuklären, wurden in einem chemisch-biologischen Ansatz die Wirkungen eines fluoreszierenden Peptids auf Modellmembranen bestehend aus binären und ternären Lipidgemischen erforscht.^[137] Die Peptide enthielten einen Farnesyl- und einen Palmitoyl-Anker und dienten auf diese Weise als Membranerkennungssystem für N-Ras-Proteine. Insbesondere untersuchte man den Einfluss des Peptids auf die laterale Organisation und auf Konzentrationsschwankungen der Lipide sowie die Möglichkeit zur molekularen Sortierung von Lipiden durch das eingelagerte Peptid.

Diese Studien führten zu dem Schluss, dass doppelt palmitoyl- und farnesyllipidierte Peptide nicht – wie aus anderen Arbeiten erwartet – bevorzugt mit flüssig-geordneten oder gelartigen Domänen in phasengetrennten Doppelschichtmembranen assoziieren. Sie zeigten insbesondere, dass das Peptid bei physiologisch relevanten Cholesterinkonzentrationen die Bildung fluider Mikrodomänen induziert und dass dieser Effekt sehr stark von der Konzentration der fluiden gegenüber den geordneten Lipidmolekülen abhängt. Das Peptid hat offensichtlich eine hohe Affinität zu einer fluiden Umgebung. Es konnte weiterhin gefolgert werden, dass das in Proteinen wie Ras gefundene Palmitoyl-Farnesyl-Doppelphospholipidmotiv die Assoziation mit flüssig-geordneten oder gelartigen Domänen in phasengetrennten Doppelschichtmembranen nicht signifikant fördert und eine Anreicherung in biologischen Lipid-Rafts allein aufgrund von Lipoprotein-Lipid-Wechselwirkungen nicht zu erwarten ist (in Analogie zu den Ergebnissen mit lediglich prenylierten Proteinen).^[32,138–140] Diese Ergebnisse scheinen mit den Befunden aus NMR-Messungen und Neutronenbeugungsstudien gut in Einklang zu sein.^[125] Die Membranassoziation von N-Ras ist aber nicht analog z.B. zu der von H-Ras, dem nach GDP-Beladung eine starke Affinität für Lipid-Rafts zugeschrieben wurde.^[141,142] Dies stimmt mit der Vorstellung überein, dass der lipidierte C-Terminus von Ras-Proteinen als einer der

Regulatoren für die spezifische Membranlokalisierung des gesamten Proteins fungiert.

Vor kurzem wurde das vollständig lipidierte und fluoreszenzmarkierte N-Ras-Protein mithilfe eines kombinierten chemischen und biologischen Ansatzes hergestellt, und auch für dieses vollständige Protein wurde eine Präferenz für die flüssig-ungeordnete Phase gegenüber der flüssig-geordneten und fest-geordneten Phase nachgewiesen.^[143] Fluoreszenzmessungen am lipidierten Protein lieferten ähnliche Ergebnisse wie beim Peptid, was darauf hinweist, dass die Membranlokalisierung bei N-Ras wahrscheinlich vollständig durch den lipidierten C-Terminus bestimmt wird, anders als z. B. bei H-Ras, dessen Lokalisation auch durch weitere Strukturelemente aus der Polypeptidstruktur beeinflusst wird.^[142]

Die Analyse der Lokalisation lipidierter N-Ras-Proteine in Lipidmikrodomänen durch Rasterkraftmikroskopie (AFM) lieferte gegenüber den Fluoreszenzmessungen eine verbesserte räumliche Auflösung (Abbildung 3). Das Lipo-

Die Pamitoylgruppe ist zwar die am häufigsten in S-acylierter Form gefundene Fettsäure, aber sie ist nicht die einzige Fettsäure, die an Proteincysteine gebunden vorkommt. Es gibt unterschiedlichste Acylierungsmuster, die die Funktionalität lipiderter Proteine deutlich beeinflussen können. Beispielsweise können die Kinasen der Src-Familie auch mit anderen Nahrungsfettsäuren als Myristat und Palmitat acyliert werden. Diese differenzierte Acylierung mit ungesättigten Fettsäuren führt dann dazu, dass die lipidierten Kinasen von den Membran-Rafts abgelöst werden.^[75] Ähnliche Studien könnten für Proteine der Ras-Familie durchgeführt werden, um ihre Lokalisation und den Einfluss des Lipidierungsmusters auf die Protein-Protein- und Protein-Lipid-Wechselwirkungen sowie nachgeschaltete Signalforgänge zu untersuchen.

5. Strukturelle und biologische Studien an lipidierten Ras- und Rab-Proteinen

5.1. Strukturbioologie von Rab-Proteinen

Um den Wirkungsmechanismus von Rab/Ypt-Proteinen (Ypt = yeast protein transport; Hefeanaloges zum Rab-Protein von Säugetieren) und ihre vesikulären Transportvorgänge in Zellen auf molekularer Ebene zu verstehen, muss man ihre Strukturen und die ihrer wechselwirkenden Proteine kennen. Tatsächlich sind die Strukturen vieler Rab-Proteine sowohl in GTP- als auch in GDP-gebundener Form bekannt.^[147–154] Dagegen wurden Kristallstrukturinformationen von Rab-Proteinen im Komplex mit Effektorproteinen bislang nicht erhalten – mit Ausnahme des Rab3A-Rabphilin-3A-Komplexes.^[155] Im Hinblick auf die zahlreichen Wechselwirkungen, an denen Rab-Proteine beteiligt sind, ist der Mangel an Strukturinformation bemerkenswert.

Ein wichtiger Wechselwirkungspartner von Rab-Proteinen ist der Rab-GDP-Dissoziationsinhibitor (GDI). GDI assoziiert mit prenylierten Rab-Proteinen und regeneriert inaktiviertes Rab-Protein (d.h. Rab mit gebundenem GDP) am Ende des Funktionszyklus an der Membran und transportiert es zurück zu den Donormembranen. Aufgrund der Bedeutung dieser Protein-Protein-Wechselwirkung befassten sich mehrere Arbeitsgruppen intensiv mit der Strukturbestimmung des Komplexes. Zunächst wurde die Struktur von GDI mit Geranylgeranylcysteinen aufgeklärt, was zur irrtümlichen Annahme führte, dass die Lipidbindungsstelle an der Domäne I oberhalb der mobilen Effektorschleife lokalisiert sei.^[156] Dieser Struktur fehlte aber das komplette, vollständig lipidierte Rab-Protein. Es wurde deshalb versucht, mithilfe eines kombinierten biologisch-chemischen Ansatzes Komplexe von mono- und diprenylierten Rab-Proteinen mit GDI zu erhalten.

Kristallisierungsstudien von Rab-Proteinen erfordern leistungsfähige Methoden, die präparative Mengen prenylierter Rab-Proteine liefern. Die Semisynthese prenylierter Rab-Proteine durch EPL erwies sich als allgemein anwendbar auf verschiedenartige Rab-Proteine und Rab-Peptide und lieferte relativ große Mengen an reinem und homogenem Proteinmaterial (siehe Abschnitt 3.2.1).^[114,115] Um die Struktur des

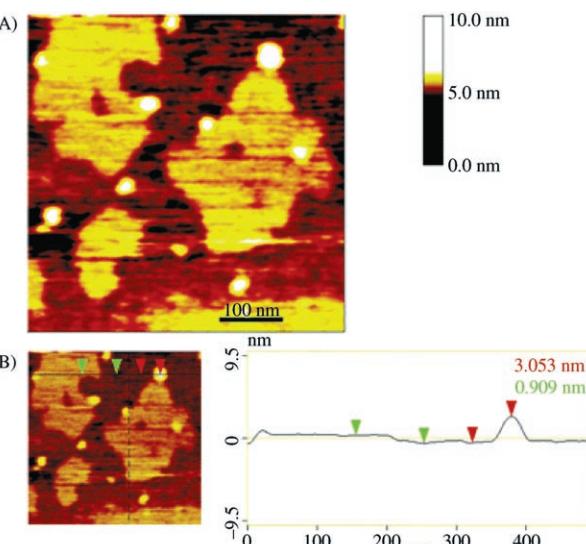


Abbildung 3. A) AFM-Aufnahme von N-Ras in Lipiddoppelschichten (POPC/BSM/Chol 2:1:1, $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$); B) Höhenprofil der AFM-Aufnahme. Das aus I_0 -Raftdomänen und I_d -Domänen hervorstehende Protein kann gezielt detektiert werden und zeigt die erwartete Höhendifferenz von etwa 3–4 nm, die ungefähr der linearen Abmessung von N-Ras entspricht.

protein ist größtenteils in der Grenzregion der Domänen in flüssig-geordneten/flüssig-ungeordneten Mischphasendoppelschichten lokalisiert. Dies könnte zu einer günstigen Verringerung der Linienenergie (Spannung) führen, die an der Randzone der entmischten Phasen auftritt. Die spezifische Lokalisation und Akkumulation von N-Ras-Proteinen in den Grenzschichten von Lipiddoppelschichtdomänen kann Protein-Protein-Wechselwirkungen begünstigen und so die Proteinassoziation vermitteln. Neuere Studien und Berechnungen zur Plasmamembran-Kompartimentierung von GFP-markierten H- und K-Ras-Konstrukten zeigten, dass lipidierte Proteine an der inneren Plasmamembran die Bildung von Nanoclustern steuern können.^[144–146]

Komplexe aus prenylierten Rab-Proteinen und GDI aufzuklären, wurde ein chemisch-biologischer Ansatz gewählt, der auf der Synthese von Rab-Proteinen durch EPL basiert. Ypt1 wurde um zwei Reste verkürzt exprimiert und mit einem C-terminalen Thioester versehen.^[116] Um die Herstellung geeigneter Mengen prenylierter Peptide zu vereinfachen, wurde ein schnell zugängliches monoprenyliertes Dicysteinpeptid verfügbar gemacht, das nach Ligation an Ypt1ΔC2 einen raschen Zugang zu präparativen Mengen prenylierter Proteine bot. Die Ligation des Cystein-enthaltenden Dipeptids an Ypt1ΔC2 führte zu nativem monoprenyliertem Ypt1. Nach Zugabe von GDI wurde durch Gelfiltration ein 1:1-Komplex aus monoprenyliertem Ypt1 und GDI isoliert, der kristallisiert werden konnte. Abbildung 4 zeigt den Teil der Komplexstruktur, in dem die Bindung des entscheidenden C-Terminus von Ypt1 in einer Tasche des GDI stattfindet.

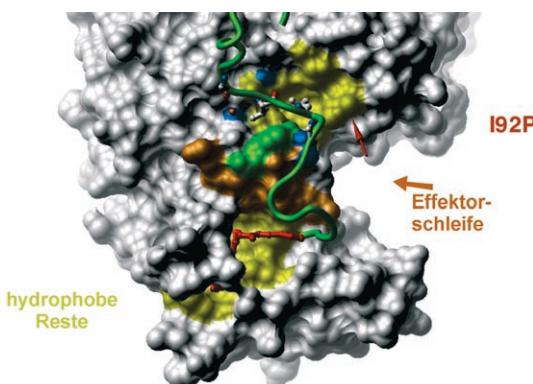


Abbildung 4. Bindung des monoprenylierten Rab1-C-Terminus an GDI; die Struktur veranschaulicht die molekulare Grundlage der durch die GDI-I92P-Mutation verursachten geistigen Retardierung.

Die Analyse des Komplexes ergab, dass die einzelne Prenylgruppe ausreichte, um die Bindung von Ypt1 an GDI zu vermitteln. Ypt1 tritt vor allem mit der stark konservierten Rab-Bindungsdomäne von GDI in Kontakt, die auf den Nucleotid-gebundenen Zustand von GTPasen ansprechenden Schalterregionen I und II enthält, was die beobachtete Präferenz von GDI für die GDP-gebundene Konformation von Rab-Proteinen erklärt. Wechselwirkungen zwischen Ypt1 und GDI basieren hauptsächlich auf dem Kontakt der letzten 20 C-terminalen Aminosäurereste von Ypt1, einschließlich der hydrophoben Isoprenoide. Die C-terminale Bindungsregion induziert eine 90°-Drehung im C-Terminus von Ypt1, was den geranylgeranylierten C-Terminus befähigt, über einen hydrophoben Bereich an GDI zu koordinieren (obere, gelb gefärbte Oberfläche in Abbildung 4). Dies ist in Einklang mit Beobachtungen, wonach Mutationen in dieser Region (z.B. I92P) zu fehlerhafter Membranextraktion und Rab-Zuführung führen.^[157, 158] Auch die Struktur von zweifach prenyliertem Ypt1 im Komplex mit GDI wurde kürzlich erhalten.^[159] In diesem Fall waren beiden Prenylgruppen in enger Nachbarschaft zueinander positioniert und befanden sich im gleichen hydrophoben Bereich wie beim monogeranylgeranylierten Ypt1. Diese Struktur lieferte ein allgemeines

Modell für die Rab:GDI/REP-Selektivität sowie für die Membranbindung und -extraktion prenylierter Rab-Proteine.

Mit den Ergebnissen, die zu den strukturellen und kinetischen Eigenschaften der GDI-Rab-Wechselwirkung erhalten wurden, konnte ein einfaches Modell für die Extraktion von Rab-Proteinen aus Membranen durch GDI und das strukturell und mechanistisch verwandte REP-Molekül formuliert werden.^[159] Nach diesem Modell können GDI oder REP die GDP-gebundene Form von Rab durch eine erste Wechselwirkung erkennen, die nur den globulären Teil der GTPase betrifft. Anschließendes Andocken des Rab-C-Terminus an GDI/REP führt zum Herauslösen der Prenyleinheiten aus der Membran, ein Vorgang, der durch die Bindung der Lipidgruppen in der stark hydrophoben GDI/REP-Bindungsregion gesteuert wird. Die treibende Kraft für den gesamten Extraktionsvorgang ist die Differenz in den Affinitäten (und damit den freien Wechselwirkungsenergien) zwischen den gebundenen Zuständen zu Beginn (nur der globuläre Teil ist beteiligt) und am Ende des Prozesses (globulärer Teil und lipidierter C-Terminus sind beteiligt). Diese Differenz ist beim GDI viel größer als beim REP, was die beobachtete größere Leistungsfähigkeit von GDI in der Lipidextraktion, seiner biologischen Hauptfunktion, erklärt. Am Zuführungsprozess – dem zur Extraktion umgekehrten Vorgang – ist wahrscheinlich ein membrangebundener Faktor GDF (GDI-displacement factor) mit Spezifität für bestimmte Rab-Moleküle beteiligt. Der Extraktions-/Zuführungsprozess verläuft so lange reversibel, wie GDP an Rab gebunden ist, wird aber irreversibel durch die Wirkung eines Austauschfaktors, der den Austausch von GDP durch GTP katalysiert und damit die Affinität von GDI/REP für Rab verringert.

5.2. Biophysik der Ras-Proteine

Semisynthesen von Ras-Lipoproteinen ermöglichten die selektive Modifizierung natürlicher Anker in den Ras-C-Termini sowie auch Bindungsstudien, die mit künstlichen Membranen ausgerüstete Biosensoren nutzen. Beziiglich der Verankerung von N-Ras an Membranen konnte nachgewiesen werden, dass zwei hydrophobe Modifikationen für eine stabile Insertion essenziell sind. Die genaue Art der Verknüpfung von Alkylgruppe und Peptid macht unter nichthydrolyzierenden Bedingungen keinen Unterschied für die Stabilität der Membranbindung. So ist die Verankerung eines natürlichen Palmitoylthioesters und eines stabilen Hexadecylthioethers am gleichen Cystein gleich stark.^[119] Des Weiteren wurde gefunden, dass sich Ras-Lipoproteine in ihrem biophysikalischen Verhalten nicht von Streptavidin-Konjugaten mit den entsprechenden biotinylierten Ras-Lipoproteiden unterscheiden,^[160] was darauf hinweist, dass spezifische Struktureigenschaften des Proteinkerns in solchen Modellexperimenten austauschbar sind, solange diese Komponente die Löslichkeit des gesamten Lipoproteinkomplexes in wässrigen Lösungen bestimmt.

Um genaueren Einblick in die Kinetik der Membranbindung lipidierter Proteine zu erhalten, wurden Experimente entworfen, die die Herstellung fluoreszierender und lipidmarkierter Peptide und Proteine voraussetzen. Lipi-

dierte Peptide, die C-terminale Ester von Cholesterin und verwandten Steroiden als Membrananker enthalten und den C-Terminus des Hedgehog-Proteins repräsentieren, wurden synthetisiert, erforscht und mit dem N-Ras-Protein ligiert.^[161] Biophysikalische und zellbiologische Fluoreszenzexperimente an diesen Hedgehog-Peptiden und modifizierten N-Ras-Proteinen zeigten, dass sich die Membranbindungseigenschaften lipidierter Peptide von denen lipidierter Proteine erheblich unterscheiden. Beispielsweise dissoziert eine Cholesterinkomponente, die Peptide fast irreversibel in Membranen einlagern kann, mit Halbwertszeiten von etwa 3 h, wenn sie an ein 20-kDa-Protein gebunden ist.

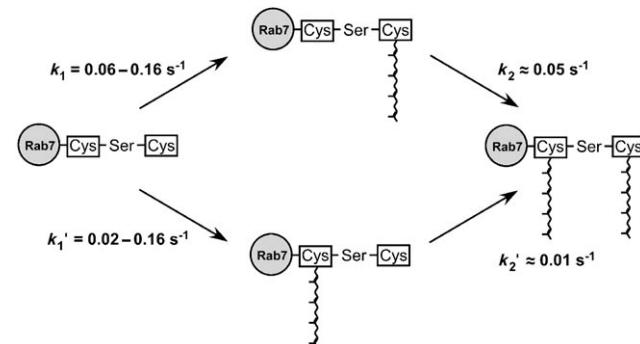
Vor kurzem gelang die Synthese von Ras-Lipoproteinen mit dem basischen C-Terminus von K-Ras4B durch Ligation exprimierter Proteine (siehe Abschnitt 3.2.1)^[48] sowie von GFP-K-Ras4B durch Konjugation des farnesylierten K-Ras4B-Terminus mit GFP über eine Cystein-Iodacetamid-Kupplung.^[38] Diese Proteinsynthesemethoden ermöglichen ausführliche Studien zur Membraninsertion dieser Ras-Isoform, die sowohl von elektrostatischen als auch hydrophoben Beiträgen gesteuert wird. Die Ergebnisse aus diesen Studien stützen das Konzept, wonach die kationischen Ladungen auf dem C-Terminus des Proteins stark mit den negativen Ladungen in der Membranschicht wechselwirken und damit zu einer effizienten Bindung des monoprenylierten K-Ras4B-Lipoproteins beitragen.^[27] Die Herstellung und Untersuchung eines GFP-Konstrukts mit einem nur aus D-Aminosäuren bestehenden C-Terminus bestätigte den elektrostatischen Mechanismus über einen hochspezifischen K-Ras4B-Membranrezeptor.^[38]

5.3. Biophysik der Rab-Proteine

Mitglieder der Ras-GTPase-Familie werden prenyliert, indem man lösliche Phosphoisoprenoide (Farnesyl oder Geranylgeranyl) mit einem oder zwei C-terminalen Cysteinresten des Zielproteins unter Bildung einer Thioetherbindung umsetzt. Bei den Rab-Proteinen wird diese Prenylierung durch die Rab-Geranylgeranyltransferase (RabGGTase oder GGTase-II) katalysiert.^[162] Dieses Enzym überträgt die Geranylgeranyleinheiten auf zwei C-terminalen Cysteine der Rab-GTPasen – bei einem breiten Spektrum von Aminosäuresequenzen – und benötigt dabei REP als zusätzlichen Faktor. Im Unterschied zu anderen Prenyltransferasen erkennt die RabGGTase keine spezifische Cystein-haltige C-terminalen Sequenz, sondern einen Komplex aus RabGTPase und REP. Die nachfolgende zweifache Prenylierung ist ein mehrstufiger Prozess, der Vermutungen zufolge einem statistisch-sequenziellen Mechanismus folgt, wobei eines der Cysteine bei der ersten Prenylierung schwach bevorzugt ist.^[163] Da selektiv funktionalisierte Rab-Proteine nicht zugänglich waren, wurden in diesen Studien stets Monocysteinmutanten der Rab-Proteine verwendet, die nur eine Näherung des nativen Zustandes abgeben. Überdies ist die exakte Abfolge der Isoprenoid-Addition kontrovers diskutiert worden.^[163,164] Es ist auch nicht völlig geklärt, in welchem Ausmaß der monoprenylierte Rab-REP-Komplex zwischen zwei Prenylierungsrunden von der RabGGTase dissoziiert.

Nach der Diprenylierung werden die konjugierten Isoprenoide vom aktiven Zentrum entfernt, um an eine Lipidbindungsstelle auf dem REP zu binden, wodurch eine Konformationsänderung induziert wird, die zur Dissoziation des Komplexes führt.^[165,166] Durch Kombination von chemischer Synthese und EPL wurden mono- und digeranylgeranylierte fluoreszierende RabGTPasen synthetisiert (siehe Abschnitt 3.2.1), die Aufschluss über diese mechanistischen Einzelheiten der Rab-Proteine gaben.^[114,115]

Die Wechselwirkungen der monoprenylierten RabGTPasen mit RabGGTase wurden durch resonante Förster-Energietransfer (FRET) unter Verwendung eines am C-Terminus angebrachten Dansylfluorophors analysiert.^[114] Die C-terminal an Cys207 prenylierte Form wechselwirkt mit RabGGTase mit mehrfach höherer Affinität als das an Cys205 prenylierte Rab7. Die höhere Affinität der prenylierten Rab-Proteine scheint auf einen Unterschied in den effektiven Assoziationsgeschwindigkeiten zurückzugehen. Vermutliche Ursache sind sterische Beschränkungen, die das aktive Zentrum der RabGGTase auf den monoprenylierten C-Terminus ausübt. Mithilfe eines umgebungsempfindlichen Fluorophors nahe der Prenylierungsstelle gelang es, einen fluoreszenzbasierten Rab-Prenylierungstest zu entwickeln. Mit diesem Testsystem wurden die Geschwindigkeiten für die Umwandlung der monoprenylierten Reaktionsintermediate in das diprenylierte Reaktionsprodukt bestimmt. Die erhaltene Geschwindigkeit stimmt hervorragend mit früher berichteten Werten für die Rab-Diprenylierung überein, die mit anderen Testsystemen ermittelt wurden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass das monoprenylierte Reaktionsintermediat umso schneller in das diprenylierte Produkt überführt wird, je fester es gebunden ist. Daraus wurde gefolgert, dass bei der Mehrzahl der Rab7-Proteine die Diprenylierung so verläuft, dass zunächst am C-terminalen Cystein prenyliert und anschließend das N-terminalen Cystein modifiziert wird (Schema 14).



Schema 14. Diprenylierung von Rab7 durch RabGGTase mit zugehörigen Geschwindigkeitskonstanten.^[114]

6. Ras-Proteine als Reagenzien in der Zellbiologie

6.1. Zelluläre Lokalisation und Transport (trafficking) von Ras-Proteinen

Nachdem die prinzipielle Funktionsfähigkeit von MIC-gebundenen Ras-Lipoproteinen in lebenden Zellen nachge-

wiesen worden war,^[119] begann man ihre Semisynthese dahingehend weiterzuentwickeln, dass mehrere funktionelle Modifikationen in das C-terminale Segment eingeführt wurden. Eine erste Aufgabe bestand darin, fluoreszierende Markergruppen, die für die Fluoreszenzmikroskopie geeignet sind, an Positionen im chemisch synthetisierten Lipopeptid anzubringen, die die biologische Aktivität des Lipoproteins nicht beeinträchtigen. Erste Studien zeigten aber, dass der Einbau einer fluoreszierenden Gruppe in die Isoprenoid-einheit nicht beide Anforderungen erfüllen konnte. Entweder war das Markermolekül zwar ausreichend klein und hydrophob, um die Größe der Farnesylfunktion nachzuahmen, hatte aber für die Beobachtung in lebenden Zellen unzureichende Fluoreszeizeigenschaften, oder es lieferte nach der Mikroinjektion brauchbare Fluoreszenzsignale, war aber zu groß oder zu polar für eine korrekte Membraninsertion der Isoprenoidkette, was einen Verlust an biologischer Aktivität nach sich zog. Das Problem wurde schließlich gelöst, indem der C-terminale Methylester gegen einen starken Fluorophor ausgetauscht wurde. Dieses neue fluoreszierende Ras-Lipoprotein konnte den Ras-Signaltransduktionsweg induzieren und ergab nach der Mikroinjektion in mehreren Zelllinien ein Fluoreszenzverteilungsmuster, das mit dem Bild entsprechender GFP-Ras-Konstrukte völlig übereinstimmte, aber bei gleicher Eignung als Fluoreszenzsonde nun einen gezielten Eingriff in den posttranslationalen Status des Lipoproteins ermöglichte (Abbildung 5).^[42]

Nach Untersuchungen an Peptiden^[167] wurde die Möglichkeit, den Modifikationszustand von Ras-Lipoproteinen extern festzulegen, zu einem Schlüsselaspekt bei der Analyse des dynamischen Transports von H- und N-Ras-Lipoproteinen zwischen der Plasmamembran und intrazellulären Membranen. Studien mit einem fluoreszenzmarkierten Ras-Lipoprotein, das anstelle des nativen Palmitoylthioesters einen nichthydrolysierbaren Alkylthioether aufwies, zeigten, dass der reversible Charakter der Verknüpfung für die konstitutive De- und Reacylierung von H- und N-Ras in der lebenden Zelle entscheidend ist (Abbildung 6).^[168] Dieser Prozess ist vermutlich grundlegend für die Steuerung der Ras-Aktivität in verschiedenen Organellen.

6.2. Kartierung der Isoprenoid-sensitiven Ras-Bindungspartner

Es gibt einige Hinweise, dass die Isoprenylgruppe in posttranslational modifiziertem Ras – neben ihrer Funktion als Membrananker – direkt an der Wechselwirkung mit Regulatoren wie dem Guanin-Nucleotid-Austauschfaktor Sos^[131] oder mit Effektoren wie der PI3-Kinase beteiligt sein könnte.^[132] Um die Rolle der Farnesyleinheit bei solchen Protein-Protein- und Protein-Lipid-Wechselwirkungen zu untersuchen, können photoaktivierbare Gruppen als neues funktiona-

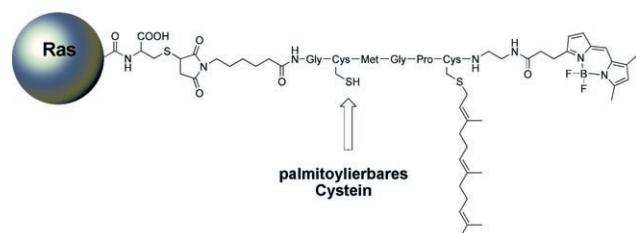
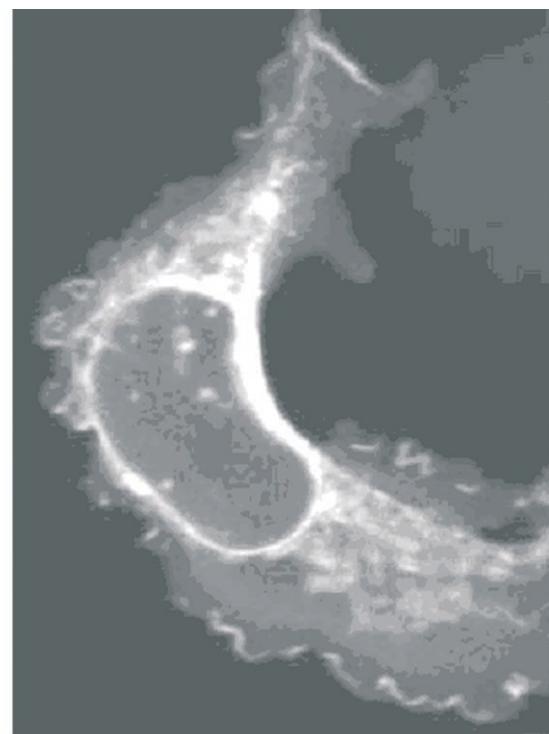


Abbildung 5. Fluoreszierende Ras-Lipoproteine mit einer BodipyFL-Gruppe am C-Terminus. Das Lipoprotein zeigt eine identische Färbung der intrazellulären Membranstrukturen (Golgi-Apparat und Plasmamembran) wie zuvor die GFP-Ras-Konstrukte.

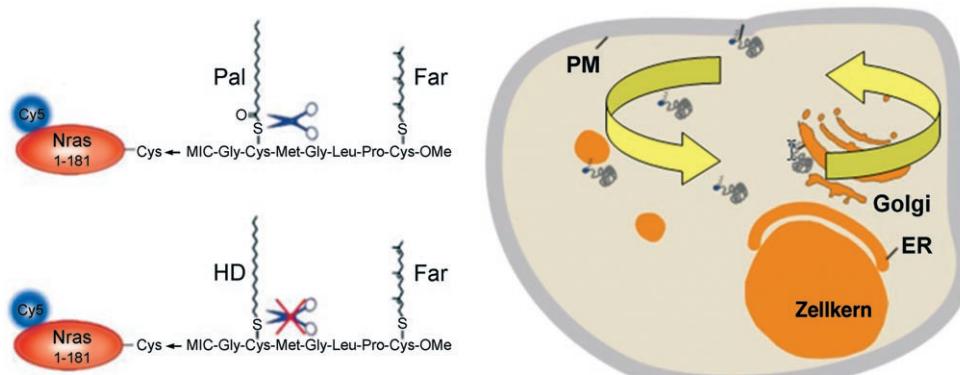
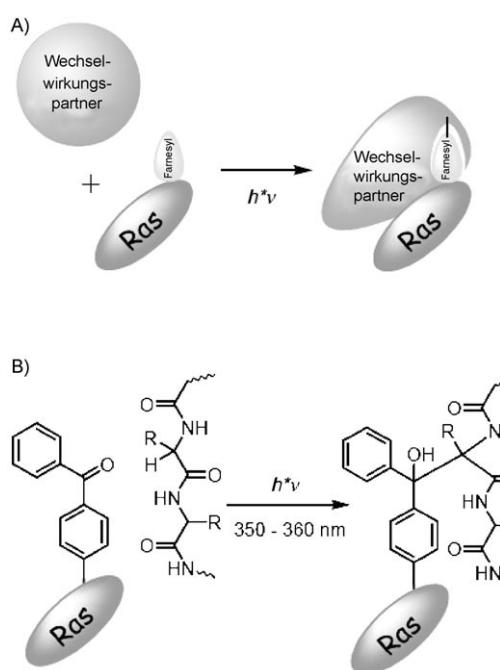


Abbildung 6. Modell des konstitutiven De- und Reacylierungszyklus von H- und N-Ras in lebenden Zellen.^[168] Nach S-Palmitoylierung der beiden Ras-Isoformen am Golgi-Apparat findet ein gerichteter vesikulärer Transport zur Plasmamembran statt, wo das Protein nach enzymatischer Hydrolyse des Thioesters freigesetzt werden kann. Ein Lipoprotein mit einem nichthydrolysierbaren Hexadecylthioether führte zu einer vollständigen Fehllokalisierung des Ras-Lipoproteins, was dafür spricht, dass eine fein abgestimmte Ras-Palmitoylierung für die korrekte Adressierung entscheidend ist.



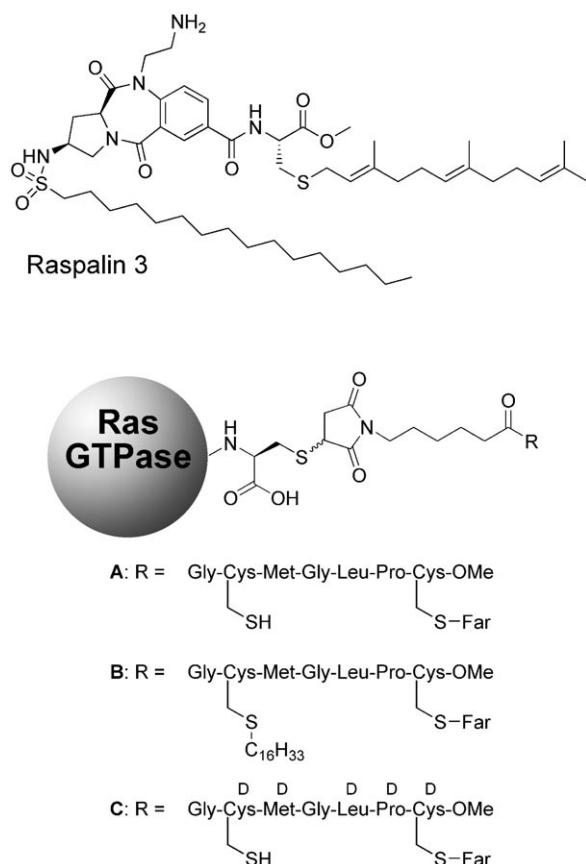
Schema 15. A) Photomarkierung Farnesyl-sensitiver Bindungsstellen in Ras-Wechselwirkungspartnern mit Benzophenon-modifizierten Isoprenstrukturen. B) Nach der Komplexbildung wird die photoaktivierbare Gruppe bestrahlt, was zur spontanen Insertion in C-H-Bindungen der Ras-Bindungspartner in unmittelbarer Nähe der Isoprenoideinheit führt.

les Element in die Ras-Lipoproteine eingeführt werden (Schema 15). Hierbei wurden Isoprenoidfragmente im Farnesylrest substituiert, wobei die Modifizierung mit Benzophenongruppen die Isoprenoidfunktion nicht zu beeinträchtigen schien. Die biologische Aktivität Benzophenon-modifizierter Ras-Konstrukte konnte dementsprechend in einem zellulären Testsystem nachgewiesen werden, bei dem Phäochromozytomzellen (PC12) nach Mikroinjektion onkogener Ras-Mutanten mit einer Isopren-Benzophenon-Modifikation zu einem Neurit-artigen Zelltyp differenzierten.^[40] Die Benzophenon-Ras-Lipoproteine zeigten nach Stimulation mit Sos eine erhöhte Nucleotidaustauschaktivität und lieferten nach Aktivierung eines Ras-Sos-Gemischs mit UV-Licht ein spezifisches Kupplungsprodukt.^[41]

Neben der Kartierung (mapping) zur Ermittlung isoprensensitiver Ras-Bindungspartner durch photoaktivierbare Lipoproteine wird gegenwärtig der Photomarkierungsansatz als eine Methode weiterentwickelt, um unbekannte Effektoren, Regulatoren oder Rezeptoren zu identifizieren. Insbesondere könnten membrangebundene Ras-Rezeptoren für den gezielten Transport der kleinen GTPasen zu den richtigen Substrukturen der Membran ausschlaggebend sein und dabei helfen, die räumlich-zeitlichen Muster der Ras-Aktivität zu erklären. Zu diesem Zweck werden membrangängige Benzophenon-Lipopeptide entwickelt, um einen proteomischen Zugang zu in eukaryotischen Zellkulturen exprimierten Proteinen zu eröffnen.

6.3. Chemisch-genetische Anwendungen von Ras-Lipopeptiden und -Lipoproteinen

Da onkogene Ras-Mutationen an der Entstehung von Krebs beteiligt sind, ist die Inhibierung der Ras-Aktivität ein vielversprechender Ansatz für die Entwicklung neuer Tumortherapeutika. Sowohl bei natürlichen als auch mutierten Ras-Proteinen hängt die Membranverankerung unvermeidlich mit der biologischen Aktivität zusammen, sodass ein Blockieren posttranslationaler Modifizierungsschritte dieses Proteins als mögliche Inhibierungsstrategie identifiziert wurde. Mittlerweile haben pharmazeutische Firmen weltweit mehrere Farnesytransferaseinhibitoren entwickelt.^[169] Die Palmitoylierung bietet sich nun als neuartige Möglichkeit an, um onkogene H- und N-Ras-Proteine zu manipulieren. Der Isoprenylierungsschritt der Ras-Proteine konnte bereits in enzymatischen Tests mit bakteriell exprimiertem Ras und Farnesytransferase untersucht werden.^[170] Kürzlich wurden zwei Enzyme entdeckt, die für die Regulation des Palmitoylierungszustands der Proteine wichtig zu sein scheinen: ein menschlicher Protein-Palmitoyltransferase-Enzymkomplex, bestehend aus DHHC9 (mit einer DHHC-Cystein-reichen Domäne) und dem palmitoylierten Membranprotein GCP16, das auf dem Golgi-Apparat lokalisiert ist,^[171] und die Acylprotein-Thioesterase 1 (APT1), die vermutlich an der Regu-



Schema 16. Oben: das Benzodiazepindion Raspalin 3, ein mit 30 nm wirksamer APT1-Inhibitor. Unten: semisynthetische Ras-Proteine, die zur Validierung von APT1 als Ras-Palmitoylierungsenzym eingesetzt wurden.

lation des posttranslationalen Modifikationszustands von N- und H-Ras beteiligt ist.^[172]

Um den Palmitoylierungsprozess nutzen zu können, wurde eine chemisch-genetische Methode unter Verwendung semisynthetischer Lipopeptide und -proteine untersucht. Es wurden APT1-Inhibitoren entwickelt (Schema 16), die die Differenzierung von PC12-Zellen durch onkogenes N-Ras verhinderten, falls dieses Protein abschließend in der Zelle palmitoyliert werden musste. Auf ein N-Ras-Lipoprotein mit vollständigem Membrananker zeigten die Inhibitoren dagegen keine Wirkung.

In-vitro-Experimente mit N-Ras-Lipopeptiden und -proteinen ergaben, dass APT1 als ein bidirektionales Enzym fungieren könnte, das je nach lokaler Umgebung und Substratangebot sowohl die Palmitoylierung als auch die Depalmitoylierung von Ras vermittelt. Hierbei erwiesen sich mehrere semisynthetische Ras-Proteine als unentbehrliche Hilfsmittel (eine kleine Auswahl ist in Schema 16 gezeigt). Beispielsweise wurde der durch Protein **A** (Schema 16) induzierte Neuritauswuchs in PC12-Zellen untersucht, und es wurde gefunden, dass ein Zusatz von Raspalin3 zu einer Verlangsamung des Neuritauswuchses führt. Auf den durch Protein **B** induzierten Neuritauswuchs zeigte Raspalin3 hingegen keine Wirkung; **B** enthält einen hydrolysebeständigen Hexadecylthioether. Das die S-Palmitoylierung katalysierende Enzym wurde durch Mikroinjektion von Protein **C** auf seine Stereoselektivität untersucht: Die Differenzierungsfizienz blieb die gleiche wie mit dem natürlichen Analogon **A**, was eine hohe Substrattoleranz des Enzyms belegt. Mit weiteren Modellpeptiden wurde nachgewiesen, dass APT1 das Ras-Protein *in vitro* depalmitoylieren und palmitoylieren kann. Zusammen mit den für semisynthetische Proteine erhaltenen Ergebnissen deutet dies darauf hin, dass APT1 höchstwahrscheinlich an der Ras-Palmitoylierung *in vivo* direkt beteiligt ist.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Die Biowissenschaften sind molekular zu verstehen. Will man Informationen aus genomischen und proteomischen Ansätzen gewinnen und biologische Probleme lösen, so ist daher eine interdisziplinäre Beteiligung der Chemie und Biologie nötig. Diese Erkenntnis hat zur Entwicklung der chemischen Biologie geführt. Die Anwendung von ursprünglich aus der Chemie stammenden Methoden und die anschließende Kombination von Chemie und Biologie ermöglichte die Untersuchung biologischer Vorgänge, die durch chemische oder biologische Methoden alleine nicht analysierbar waren.^[173,174] Dieser forschungsintegrierende Ansatz wurde hier anhand der Synthese und biologischen Untersuchung von lipidierten Peptiden und Proteinen aus der Ras-Superfamilie illustriert.

Von entscheidender Bedeutung für solche integrierten Forschungsvorhaben ist der einfache Zugang zu beliebig modifizierbaren Proteinen, die präzise Ergebnisse auf molekularer Ebene liefern, wie sie mit biologischen Methoden alleine kaum erhältlich wären. Der erste Teil dieses Aufsatzes befasste sich mit den Fortschritten, die bei der Synthese lipi-

dierter Peptide aus der Ras-Superfamilie erreicht wurden. Zur Synthese der meisten der benötigten Peptide kommen bevorzugt neuere Festphasenmethoden zum Einsatz. Diese machen native und modifizierte Peptide auch in Mengen zugänglich, die materialintensive Untersuchungen wie Kristallstrukturanalysen ermöglichen. Für spezifische Aufgaben entworfene Peptide wurden mittlerweile in vielfältigen bio-physikalischen Studien eingesetzt. Es wurden chemisch-biologische Methoden besprochen, um lipidierte Peptide mit verkürzten Ras- oder Rab-Proteinen zu verknüpfen. Dieser Ansatz führte zur Synthese zuvor nicht verfügbarer Proteine – sowohl in markierter als auch nichtmarkierter Form –, die zur Aufklärung vieler biologischer Aspekte der Ras-GTPasen genutzt wurden.

Es spricht vieles dafür, dass die Erforschung von Proteinen der Ras-Superfamilie durch chemisch-biologische Methoden auch in Zukunft wichtige Ergebnisse liefern wird. Nach unserer Sicht werden sich die Forschungen zu diesen Proteinen in den kommenden Jahren auf die zelluläre Lokalisierung, das Trafficking und den Stoffwechsel sowie auf die Identifizierung und Strukturbestimmung ihrer Komplexe mit Wechselwirkungspartnern konzentrieren. Die chemischen Methoden, um die meisten der benötigten Proteine herzustellen, sind bereits entwickelt worden. Vom chemischen Standpunkt aus gesehen, können die zur Synthese von Ras-Lipopeptiden und -Proteinen entwickelten Methoden nun auch für andere Proteine mit verschiedenartigen und nicht einfach zugänglichen Lipidmotiven eingesetzt werden.

Abkürzungen

AA	Aminosäure
Aloc	Allyloxycarbonyl
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
BSM	Hirn-Sphingomyelin
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]propansulfonsäure
Chol	Cholesterin
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid
Far	Farnesyl
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
GDI	GDP-Dissoziationsinhibitor
GDF	GDI-Displacement-Faktor
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HBTU	<i>O</i> -Benzotriazol- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin

Pal	Palmitoyl
POPC	Palmitoyloylphosphatidylcholin
PTMSEL	(2-Phenyl-2-trimethylsilyl)ethyl
PyBop	Benzotriazol-1-yl-oxytritypyrrolidino-phosphoniumhexafluorophosphat
REP	Rab-Eskortprotein
SPPS	Festphasenpeptidsynthese
TES	Triethylsilyl
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
TMP	Trimethylpyridin

Wir danken unseren im Literaturteil erwähnten Mitarbeitern und Kollegen auf dem Gebiet der chemischen Biologie der Ras-GTPasen für anregende Diskussionen. L.B. dankt der Alexander-von-Humboldt-Stiftung für Unterstützung durch den Sofja Kovalevskaja Award. Unsere Forschungen wurden von der Max-Planck-Gesellschaft, der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Volkswagen-Stiftung und dem Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.

Eingegangen am 6. März 2006
Übersetzt von Dr. Margit Knauer, Bensheim

-
- [1] Y. Takai, T. Sasaki, T. Matozaki, *Physiol. Rev.* **2001**, *81*, 153–208.
[2] M. Barbacid, *Annu. Rev. Biochem.* **1987**, *56*, 779–827.
[3] M. H. Gelb, *Science* **1997**, *275*, 1750–1751.
[4] J. Kuhlmann, *Methods Mol. Biol.* **2004**, *283*, 217–220 („Bioconjugation Protocols: Strategies and Methods“).
[5] J. L. Bos, *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1333*, M19–M31.
[6] D. J. G. Mackay, A. Hall, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 20685–20688.
[7] M. Zerial, H. McBride, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2*, 107–117.
[8] J. B. Bock, H. T. Matern, A. A. Peden, R. H. Scheller, *Nature* **2001**, *409*, 839–841.
[9] M. S. Moore, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 22857–22860.
[10] I. R. Vetter, C. Nowak, T. Nishimoto, J. Kuhlmann, A. Wittighofer, *Nature* **1999**, *398*, 39–46.
[11] M. D. Resh, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1451*, 1–16.
[12] J. T. Dunphy, M. E. Linder, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1436*, 245–261.
[13] F. L. Zhang, P. J. Casey, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 241–269.
[14] A. I. Magee, L. Gutierrez, I. A. McKay, C. J. Marshall, A. Hall, *EMBO J.* **1987**, *6*, 3353–3357.
[15] J. A. Duncan, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 23594–23600.
[16] Y. T. Guo, Y. M. Li, Y. F. Zhao, *Chin. J. Org. Chem.* **2004**, *24*, 722–727.
[17] A. Watzke, L. Brunsved, T. Durek, K. Alexandrov, A. Rak, R. S. Goody, H. Waldmann, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1157–1164.
[18] B. L. Nilsson, M. B. Soellner, R. T. Raines, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2005**, *34*, 91–118.
[19] F. R. Naider, J. M. Becker, *Biopolymers* **1997**, *43*, 3–14.
[20] D. Kadereit, H. Waldmann, *Monatsh. Chem.* **2000**, *131*, 571–584.
[21] D. Kadereit, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *ChemBioChem* **2000**, *1*, 144–169.
[22] C. Peters, M. Wagner, M. Völker, H. Waldmann, *Naturwissenschaften* **2002**, *89*, 381–390.
[23] F. Eisele, D. J. Owen, H. Waldmann, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 193–224.
[24] O. Seitz, I. Heinemann, A. Mattes, H. Waldmann, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 2247–2277.
[25] I. Heinemann, M. Völker, H. Waldmann, *Methods Mol. Biol.* **2004**, *283*, 221–232 („Bioconjugation Protocols: Strategies and Methods“).
[26] L. Pegoraro, L. Moroder in *Houben-Weyl Methods of Organic Chemistry, Synthesis of Peptides and Peptidomimetics, Vol. E* **22b** (Hrsg.: M. Goodman, A. Felix, L. Moroder, C. Toniolo), Thieme, Stuttgart **2003**, S. 333–374.
[27] R. Leventis, J. R. Silvius, *Biochemistry* **1998**, *37*, 7640–7648.
[28] S. Quesnel, J. R. Silvius, *Biochemistry* **1994**, *33*, 13340–13348.
[29] S. Shahinian, J. R. Silvius, *Biochemistry* **1995**, *34*, 3813–3822.
[30] J. R. Silvius, *Prog. Protein-Lipid Interact.* **2002**, *52*, 371–395.
[31] J. R. Silvius, F. Lheureux, *Biochemistry* **1994**, *33*, 3014–3022.
[32] T. Y. Wang, R. Leventis, J. R. Silvius, *Biophys. J.* **2000**, *79*, 919–933.
[33] D. Kadereit, P. Deck, I. Heinemann, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 1184–1193.
[34] D. Kadereit, H. Waldmann, *ChemBioChem* **2000**, *1*, 200–203.
[35] C. B. Xue, J. M. Becker, F. Naider, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 1435–1438.
[36] L. Liu, G. F. Jang, C. C. Farnsworth, K. Yokoyama, J. A. Glomset, M. H. Gelb, *Methods Enzymol.* **1995**, *250*, 189–206 („Lipid Modifications of Proteins“).
[37] F. Ghomashchi, X. H. Zhang, L. Liu, M. H. Gelb, *Biochemistry* **1995**, *34*, 11910–11918.
[38] N. M. Okeley, M. H. Gelb, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 21833–21840.
[39] M. Berezovski, W. P. Li, C. D. Poulter, S. N. Krylov, *Electrophoresis* **2002**, *23*, 3398–3403.
[40] J. Kuhlmann, A. Tebbe, M. Völker, M. Wagner, K. Uwai, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2655–2658; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2546–2550.
[41] M. Völker, K. Uwai, A. Tebbe, B. Popkirova, M. Wagner, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12749–12758.
[42] R. Reents, M. Wagner, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 2765–2768; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2711–2714.
[43] R. Reents, M. Wagner, S. Schlummer, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 86–94.
[44] W. F. Degrado, E. T. Kaiser, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 1295–1300.
[45] E. K. Dolence, J. M. Dolence, C. D. Poulter, *J. Comb. Chem.* **2000**, *2*, 522–536.
[46] E. K. Dolence, J. M. Dolence, C. D. Poulter, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 35–43.
[47] B. Ludolph, F. Eisele, H. Waldmann, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 901–904.
[48] D. Gottlieb, C. Grunwald, C. Nowak, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *Chem. Commun.* **2006**, 260–262.
[49] T. Wieland, J. Lewalter, C. Birr, *Justus Liebig Ann. Chem.* **1970**, *740*, 31–47.
[50] A. N. Semenov, K. Y. Gordeev, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1995**, *45*, 303–304.
[51] C. R. Millington, R. Quarrell, G. Lowe, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 7201–7204.
[52] C. Rosenbaum, H. Waldmann, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5677–5680.
[53] C. Peters, H. Waldmann, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 6053–6055.
[54] B. Ludolph, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 3683–3691.
[55] B. Ludolph, F. Eisele, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5954–5955.
[56] G. Kragol, M. Lumbierres, J. M. Palomo, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 5963–5966; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5839–5842.

- [57] L. Brunsved, A. Watzke, T. Durek, K. Alexandrov, R. S. Goody, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 2756–2772.
- [58] M. Lumbierres, J. M. Palomo, G. Kragol, S. Roehrs, O. Müller, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 7405–7415.
- [59] M. Völkert, S. Koul, G. H. Müller, M. Lehnig, H. Waldmann, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 6902–6910.
- [60] J. A. Camarero, B. J. Hackel, J. J. de Yoreo, A. R. Mitchell, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4145–4151.
- [61] B. J. Backes, J. A. Ellman, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2322–2330.
- [62] J. M. Palomo, M. Lumbierres, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 491–495; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 477–481.
- [63] M. Lumbierres, J. M. Palomo, G. Kragol, H. Waldmann, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 2671–2674.
- [64] M. Joseph, R. Nagaraj, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 1025–1028.
- [65] N. Pfender, E. Guénin, J. M. Greer, E. Trifilieff, *Lett. Pept. Sci.* **2003**, *10*, 581–588.
- [66] B. Denis, E. Trifilieff, *J. Pept. Sci.* **2000**, *6*, 372–377.
- [67] D. T. S. Rijkers, J. A. W. Kruijzer, J. A. Killian, R. M. J. Lisickamp, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 3341–3345.
- [68] A. Harishchandran, B. Pallavi, R. Nagaraj, *Protein Pept. Lett.* **2002**, *9*, 411–417.
- [69] B. Pallavi, R. Nagaraj, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 12737–12744.
- [70] S. P. Creaser, B. R. Peterson, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2444–2445.
- [71] P. Mayer-Fligge, J. Volz, U. Krüger, E. Sturm, W. Gernhardt, K. P. Schäfer, M. Przybylski, *J. Pept. Sci.* **1998**, *4*, 355–363.
- [72] K. Pachamuthu, X. M. Zhu, R. R. Schmidt, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 3720–3723.
- [73] Y. Zhu, W. A. van der Donk, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1189–1192.
- [74] D. P. Galonic, N. D. Ide, W. A. van der Donk, D. Y. Gin, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7359–7369.
- [75] X. Q. Liang, A. Nazarian, H. Erdjument-Bromage, W. Bornmann, P. Tempst, M. D. Resh, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 30987–30994.
- [76] R. S. Goody, K. Alexandrov, M. Engelhard, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 399–403.
- [77] L. J. Knoll, J. I. Gordon, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 4281–4290.
- [78] M. J. Page, A. Hall, S. Rhodes, R. H. Skinner, V. Murphy, M. Sydenham, P. N. Lowe, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 19147–19154.
- [79] H. Horiuchi, O. Ullrich, C. Bucci, M. Zerial, *Methods Enzymol.* **1995**, *257*, 9–15 („Small GTPases and Their Regulators Part C: Proteins Involved in Transport“).
- [80] A. Kikuchi, T. Yamashita, M. Kawata, K. Yamamoto, K. Ikeda, T. Tanimoto, Y. Takai, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 2897–2904.
- [81] T. Magee, M. C. Seabra, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2005**, *17*, 190–196.
- [82] T. W. Muir, D. Sondhi, P. A. Cole, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 6705–6710.
- [83] R. M. Hofmann, T. W. Muir, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 297–303.
- [84] T. J. Tolbert, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5421–5428.
- [85] J. P. Tam, J. X. Xu, K. D. Eom, *Biopolymers* **2001**, *60*, 194–205.
- [86] G. G. Kochendoerfer, S. B. H. Kent, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 665–671.
- [87] T. A. Kale, S. J. Hsieh, M. W. Rose, M. D. Distefano, *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, *3*, 1043–1074.
- [88] A. Kalinin, N. H. Thoma, A. Iakovenko, I. Heinemann, E. Rostkova, A. T. Constantinescu, K. Alexandrov, *Protein Expression Purif.* **2001**, *22*, 84–91.
- [89] T. Dudler, M. H. Gelb, *Biochemistry* **1997**, *36*, 12434–12441.
- [90] P. Mcgeady, S. Kuroda, K. Shimizu, Y. Takai, M. H. Gelb, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 26347–26351.
- [91] D. J. Owen, K. Alexandrov, E. Rostkova, A. J. Scheidig, R. S. Goody, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 570–573; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 509–512.
- [92] N. H. Thoma, A. Iakovenko, D. Owen, A. S. Scheidig, H. Waldmann, R. S. Goody, K. Alexandrov, *Biochemistry* **2000**, *39*, 12043–12052.
- [93] T. C. Turek, I. Gaon, M. D. Distefano, C. L. Strickland, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 3253–3264.
- [94] T. C. Turek-Etienne, C. L. Strickland, M. D. Distefano, *Biochemistry* **2003**, *42*, 3716–3724.
- [95] T. A. Kale, M. D. Distefano, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 609–612.
- [96] T. A. Kale, C. Raab, N. Yu, E. Aquino, D. C. Dean, M. D. Distefano, *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2003**, *46*, 29–54.
- [97] M. W. Rose, J. H. Xu, T. A. Kale, G. O'Doherty, G. Barany, M. D. Distefano, *Biopolymers* **2005**, *80*, 164–171.
- [98] X. H. Liu, G. D. Prestwich, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 20–21.
- [99] X. H. Liu, G. D. Prestwich, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2137–2140.
- [100] M. K. Kim, T. S. Kleckley, A. J. Wiemer, S. A. Holstein, R. J. Hohl, D. F. Wiemer, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 8186–8193.
- [101] R. Shchepin, R. Dumitru, K. W. Nickerson, M. Lund, P. H. Dussault, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 639–641.
- [102] K. A. H. Chehade, D. A. Andres, H. Morimoto, H. P. Spielmann, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 3027–3033.
- [103] K. A. H. Chehade, K. Kiegel, R. J. Isaacs, J. S. Pickett, K. E. Bowers, C. A. Fierke, D. A. Andres, H. P. Spielmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8206–8219.
- [104] E. Micali, K. A. H. Chehade, R. J. Isaacs, D. A. Andres, H. P. Spielmann, *Biochemistry* **2001**, *40*, 12254–12265.
- [105] T. Subramanian, Z. W. Wang, J. M. Troutman, D. A. Andres, H. P. Spielmann, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2109–2112.
- [106] J. M. Troutman, M. J. Roberts, D. A. Andres, H. P. Spielmann, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 1209–1217.
- [107] J. M. Troutman, K. A. H. Chehade, K. Kiegel, D. A. Andres, H. P. Spielmann, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4979–4982.
- [108] Y. Kho, S. C. Kim, C. Jiang, D. Barma, S. W. Kwon, J. K. Cheng, J. Jaunbergs, C. Weinbaum, F. Tamanoi, J. Falck, Y. M. Zhao, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 12479–12484.
- [109] G. T. Hermanson in *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, London, **1996**, S. 297–418.
- [110] T. W. Muir, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 249–289.
- [111] S. R. Chong, F. B. Mersha, D. G. Comb, M. E. Scott, D. Landry, L. M. Vence, F. B. Perler, J. Benner, R. B. Kucera, C. A. Hirvonen, J. J. Pelletier, H. Paulus, M. Q. Xu, *Gene* **1997**, *192*, 271–281.
- [112] O. Martinez, B. Goud, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1404*, 101–112.
- [113] T. Durek, R. S. Goody, K. Alexandrov, *Methods Mol. Biol.* **2004**, *283*, 233–244 („Bioconjugation Protocols: Strategies and Methods“).
- [114] T. Durek, K. Alexandrov, R. S. Goody, A. Hildebrand, I. Heinemann, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16368–16378.
- [115] K. Alexandrov, I. Heinemann, T. Durek, V. Sidorovitch, R. S. Goody, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5648–5649.
- [116] A. Rak, O. Pylypenko, T. Durek, A. Watzke, S. Kushnir, L. Brunsved, H. Waldmann, R. S. Goody, K. Alexandrov, *Science* **2003**, *302*, 646–650.
- [117] A. Wittinghofer, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4360–4383; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4193–4214.
- [118] M. Wagner, J. Kuhlmann, *Methods Mol. Biol.* **2004**, *283*, 245–254 („Bioconjugation Protocols: Strategies and Methods“).
- [119] B. Bader, K. Kuhn, D. J. Owen, H. Waldmann, A. Wittinghofer, J. Kuhlmann, *Nature* **2000**, *403*, 223–226.
- [120] A. D. de Araújo, J. M. Palomo, J. Cramer, M. Köhn, H. Schröder, R. Wacker, C. Niemeyer, K. Alexandrov, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 302–307; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 296–301.

- [121] E. F. Pai, W. Kabsch, U. Krengel, K. C. Holmes, J. John, A. Wittinghofer, *Nature* **1989**, *341*, 209–214.
- [122] M. V. Milburn, L. Tong, A. M. Devos, A. Brunger, Z. Yamazumi, S. Nishimura, S. H. Kim, *Science* **1990**, *247*, 939–945.
- [123] P. J. Kraulis, P. J. Domaille, S. L. Campbell-Burk, T. Vanaken, E. D. Laue, *Biochemistry* **1994**, *33*, 3515–3531.
- [124] D. Huster, K. Kuhn, D. Kadereit, H. Waldmann, K. Arnold, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1083–1085; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1056–1058.
- [125] D. Huster, A. Vogel, C. Katzka, H. A. Scheidt, H. Binder, S. Dante, T. Gutberlet, O. Zschornig, H. Waldmann, K. Arnold, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4070–4079.
- [126] A. Vogel, C. P. Katzka, H. Waldmann, K. Arnold, M. F. Brown, D. Huster, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12263–12272.
- [127] G. Reuther, K.-T. Tan, J. Köhler, C. Nowak, A. Pampel, K. Arnold, J. Kuhlmann, H. Waldmann, D. Huster, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5513–5517; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5387–5390.
- [128] A. A. Gorfe, R. Pellarin, A. Caflisch, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15277–15286.
- [129] M. Sinensky, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1529*, 203–209.
- [130] S. J. McTaggart, *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, *63*, 255–267.
- [131] E. Porfiri, T. Evans, P. Chardin, J. F. Hancock, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 22672–22677.
- [132] I. Rubiol, U. Wittig, C. Meyer, R. Heinze, D. Kadereit, H. Waldmann, L. Downward, R. Wetzker, *Eur. J. Biochem.* **1999**, *266*, 70–82.
- [133] H. B. Zhang, X. H. Liu, K. Zhang, C. K. Chen, J. M. Frederick, G. D. Prestwich, W. Baehr, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 407–413.
- [134] M. Edidin, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2003**, *32*, 257–283.
- [135] A. G. Lee, *Mol. Biosyst.* **2005**, *1*, 203–212.
- [136] R. M. Epand, *Biopolymers* **1997**, *43*, 15–24.
- [137] S. Janosch, C. Nicolini, B. Ludolph, C. Peters, M. Völkert, T. L. Hazlet, E. Gratton, H. Waldmann, R. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7496–7503.
- [138] T. Y. Wang, R. Leventis, J. R. Silvius, *Biochemistry* **2001**, *40*, 13031–13040.
- [139] K. A. Melkonian, A. G. Ostermeyer, J. Z. Chen, M. G. Roth, D. A. Brown, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 3910–3917.
- [140] S. Moffett, D. A. Brown, M. E. Linder, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 2191–2198.
- [141] I. A. Prior, A. Harding, J. Yan, J. Sluimer, R. G. Parton, J. F. Hancock, *Nat. Cell Biol.* **2001**, *3*, 368–375.
- [142] B. Rotblat, I. A. Prior, C. Muncke, R. G. Parton, Y. Kloog, Y. I. Henis, J. F. Hancock, *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 6799–6810.
- [143] C. Nicolini, J. Baranski, S. Schlummer, J. M. Palomo, M. Lumbierres, M. Kahms, J. Kuhlmann, S. Sanchez, E. Gratton, H. Waldmann, R. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 192–201.
- [144] S. J. Plowman, C. Muncke, R. G. Parton, J. F. Hancock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 15500–15505.
- [145] S. Roy, S. Plowman, B. Rotblat, I. A. Prior, C. Muncke, S. Grainger, R. G. Parton, Y. I. Henis, Y. Kloog, J. F. Hancock, *Mol. Cell. Biol.* **2005**, *25*, 6722–6733.
- [146] J. F. Hancock, R. G. Parton, *Biochem. J.* **2005**, *389*, 1–11.
- [147] J. J. Dumas, Z. Y. Zhu, J. L. Connolly, D. G. Lambright, *Structure* **1999**, *7*, 413–423.
- [148] D. Chattopadhyay, G. Langsley, M. Carson, R. Recacha, L. DeLucas, C. Smith, *Acta Crystallogr. Sect. D* **2000**, *56*, 937–944.
- [149] C. Stroupe, A. T. Brunger, *J. Mol. Biol.* **2000**, *304*, 585–598.
- [150] H. Esters, K. Alexandrov, A. T. Constantinescu, R. S. Goody, A. J. Scheidig, *J. Mol. Biol.* **2000**, *298*, 111–121.
- [151] A. Iakovenko, E. Rostkova, E. Merzlyak, A. M. Hillebrand, N. H. Thoma, R. S. Goody, K. Alexandrov, *FEBS Lett.* **2000**, *468*, 155–158.
- [152] A. T. Constantinescu, A. Rak, K. Alexandrov, H. Esters, R. S. Goody, A. J. Scheldig, *Structure* **2002**, *10*, 569–579.
- [153] A. Rak, A. Niculae, A. Kalinin, N. H. Thoma, V. Sidorovitch, R. S. Goody, K. Alexandrov, *Protein Expression Purif.* **2002**, *25*, 23–30.
- [154] A. Rak, O. Pylypenko, A. Niculae, K. Pyatkov, R. S. Goody, K. Alexandrov, *Cell* **2004**, *117*, 749–760.
- [155] C. Ostermeier, A. T. Brunger, *Cell* **1999**, *96*, 363–374.
- [156] Y. An, Y. Shao, C. Alory, J. Matteson, T. Sakisaka, W. Chen, R. A. Gibbs, I. A. Wilson, W. E. Balch, *Structure* **2003**, *11*, 347–357.
- [157] P. D'Adamo, A. Menegon, C. Lo Nigro, M. Grasso, M. Guliano, F. Tamanini, T. Bienvenu, A. K. Gedeon, B. Oostra, S. K. Wu, A. Tandon, F. Valtorta, W. E. Balch, J. Chelly, D. Toniolo, *Nat. Gen.* **1998**, *19*, 134–139.
- [158] P. M. Gilbert, C. G. Burd, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 8014–8020.
- [159] O. Pylypenko, A. Rak, T. Durek, S. Kushnir, B. E. Dursina, N. H. Thomae, A. T. Constantinescu, L. Brunsved, A. Watzke, H. Waldmann, R. S. Goody, K. Alexandrov, *EMBO J.* **2006**, *25*, 13–23.
- [160] M. Schelhaas, E. Nagele, N. Kuder, B. Bader, J. Kuhlmann, A. Wittinghofer, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1239–1252.
- [161] C. Peters, A. Wolf, M. Wagner, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 8531–8536.
- [162] P. J. Casey, M. C. Seabra, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 5289–5292.
- [163] F. Shen, M. C. Seabra, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 3692–3698.
- [164] N. H. Thoma, A. Niculae, R. S. Goody, K. Alexandrov, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 48631–48636.
- [165] N. H. Thoma, A. Iakovenko, A. Kalinin, H. Waldmann, R. S. Goody, K. Alexandrov, *Biochemistry* **2001**, *40*, 268–274.
- [166] O. Pylypenko, A. Rak, R. Reents, A. Niculae, V. Sidorovitch, M. D. Vioaca, E. Bessolitsyna, N. H. Thoma, H. Waldmann, I. Schlichting, R. S. Goody, K. Alexandrov, *Mol. Cell* **2003**, *11*, 483–494.
- [167] H. Schroeder, R. Leventis, S. Rex, M. Schelhaas, E. Nagele, H. Waldmann, J. R. Silvius, *Biochemistry* **1997**, *36*, 13102–13109.
- [168] O. Rocks, A. Peyker, M. Kahms, P. J. Verveer, C. Koerner, M. Lumbierres, J. Kuhlmann, H. Waldmann, A. Wittinghofer, P. I. H. Bastiaens, *Science* **2005**, *307*, 1746–1752.
- [169] A. D. Basso, P. Kirschmeier, W. R. Bishop, *J. Lipid Res.* **2006**, *47*, 15–31.
- [170] M. Thutewohl, L. Kissau, B. Popkirova, I. M. Karaguni, T. Nowak, M. Bate, J. Kuhlmann, O. Müller, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3768–3772; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3616–3620.
- [171] J. T. Swarthout, S. Lobo, L. Farh, M. R. Croke, W. K. Green-tree, R. J. Deschenes, M. E. Linder, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 31141–31148.
- [172] P. Deck, D. Pendzialek, M. Biel, M. Wagner, B. Popkirova, B. Ludolph, G. Kragol, J. Kuhlmann, A. Giannis, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 5055–5060; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4975–4980.
- [173] M. E. Hahn, T. W. Muir, *Trends Biochem. Sci.* **2005**, *30*, 26–34.
- [174] M. R. Pratt, C. R. Bertozzi, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 58–68.