



## Direkte Modulation von Rab-GTPase-Effektor-Wechselwirkungen\*\*

Jochen Spiegel, Philipp M. Cromm, Aymelt Itzen, Roger S. Goody, Tom N. Grossmann\* und Herbert Waldmann\*

**Abstract:** Kleine GTPasen fungieren als molekulare Schalter bei der Kontrolle zahlreicher essenzieller zellulärer Prozesse. Während eine fehlerhafte Funktion oder Regulierung von GTPasen in einer Vielzahl von humanen Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt, hat es sich als schwierig erwiesen, diese Proteinklasse direkt zu adressieren, da ihre Regulierung und biologische Wirkung über ausgedehnte und gering profilierte Proteinoberflächen vermittelt werden. Hier beschreiben wir die Entwicklung von Inhibitoren für Protein-Protein-Wechselwirkungen von Rab-GTPasen, die eine Schlüsselrolle bei der Regulation vesikulärer Transportprozesse spielen. Auf der Basis von Kristallstrukturen von Rab-Proteinen gebunden an ihre Wechselwirkungspartner wurden so genannte „stapled peptides“ entwickelt. Diese Peptide zeichnen sich durch signifikant gesteigerte Affinitäten aus. Eines der modifizierten Peptide, StRIP3, bindet selektiv an aktives Rab8a und inhibiert eine Rab8a-Effektor-Wechselwirkung *in vitro*.

**K**leine GTPasen sind an der Kontrolle einer Vielzahl grundlegender zellulärer Prozesse, wie Wachstum, Differenzierung und Fortbestand, sowie an vesikulären und Membrantransportprozessen beteiligt.<sup>[1]</sup> Als molekulare Schalter alternieren sie zwischen einer inaktiven GDP-gebundenen und einer aktiven GTP-gebundenen Form. Die Aktivierung und Signalweiterleitung von GTPasen werden durch Protein-Protein-Wechselwirkungen (PPIs) vermittelt, darunter die Bindung von Nukleotidaustauschfaktoren („guanine nucleotide exchange factors“, GEFs) und GTPase-aktivierenden Proteinen (GAPs). GEFs stabilisieren den nukleotidfreien (NF) Zustand und katalysieren dadurch den Nukleotidaustausch von GDP zu GTP, wohingegen GAPs durch die Bindung an GTP-gebundene Proteine die niedrige intrinsische GTPase-Aktivität stimulieren.<sup>[2,3]</sup> Der Wechsel zwischen

beiden Bindungszuständen geht mit ausgeprägten Konformationsänderungen einher und ermöglicht es aktivierten GTPasen, spezifisch Effektorproteine zu binden und dadurch Signale intrazellulär weiterzuleiten. Die fehlerhafte Aktivierung kleiner GTPasen ist an zahlreichen humanen Erkrankungen beteiligt, was Mitglieder dieser Proteinfamilie attraktiv für Medikamentenentwicklungen macht.<sup>[4]</sup> So sind beispielsweise Rab-Proteine („Ras-related in brain“) die Schlüsselregulatoren vesikulärer Transportprozesse in Zellen. Fehlfunktion von Rab-GTPasen werden in zunehmendem Maße mit einer Reihe von vererbten und erworbenen Krankheiten in Verbindung gebracht, darunter neurodegenerative Erkrankungen und verschiedene Formen von Krebs.<sup>[5]</sup>

Allerdings hat es sich im Allgemeinen als sehr schwierig erwiesen, direkt auf die Aktivität und Funktion von GTPasen Einfluss zu nehmen. Insbesondere stellt die direkte Modulation der PPIs von GTPasen eine große Herausforderung dar,<sup>[6]</sup> da die entsprechenden Wechselwirkungsflächen wenige wohldefinierte Bindungstaschen aufweisen. Nur in wenigen Fällen wurden bisher Modulatoren von GTPase-Protein-Wechselwirkungen beschrieben,<sup>[7]</sup> wovon die meisten auf Wechselwirkungen des Ras-Proteins<sup>[8]</sup> mit besonderem Fokus auf die Ras-GEF-Wechselwirkungen abzielten.<sup>[9]</sup> Chemische Verbindungen, die direkt auf Rab-GTPasen einwirken können, wurden bisher nicht beschrieben. Stabilisierte helikale Peptide wurden bereits erfolgreich als Modulatoren von PPIs eingesetzt, die sich als äußerst schwierig für die Inhibierung mithilfe von niedermolekularen Liganden erwiesen hatten.<sup>[10]</sup> Hier beschreiben wir die Inhibierung einer Rab8-Effektor-Wechselwirkung unter Verwendung modifizierter Peptide, die von  $\alpha$ -helikalen Bindungsmotiven der Rab-Wechselwirkungspartner abgeleitet und durch hydrophobe

[\*] J. Spiegel,<sup>[+]</sup> P. M. Cromm,<sup>[+]</sup> Dr. T. N. Grossmann, Prof. Dr. H. Waldmann  
Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie  
Abteilung Chemische Biologie  
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)  
und  
Technische Universität Dortmund  
Fakultät für Chemie und Chemische Biologie  
Otto-Hahn-Straße 6, 44227 Dortmund (Deutschland)  
E-Mail: tom.grossmann@mpi-dortmund.mpg.de  
herbert.waldmann@mpi-dortmund.mpg.de

Prof. Dr. A. Itzen  
Center for Integrated Protein Science München  
Department Chemie, Technische Universität München  
Lichtenbergstraße 4, 85748 Garching (Deutschland)  
Prof. Dr. R. S. Goody  
Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie  
Abteilung Physikalische Biochemie  
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)

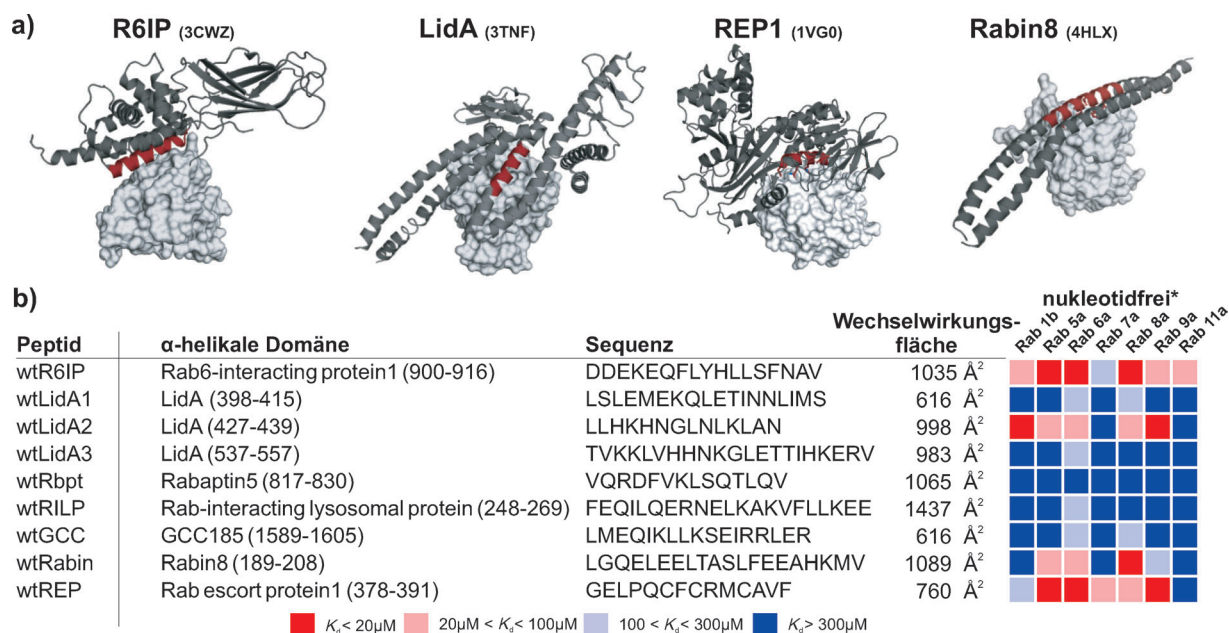
Dr. T. N. Grossmann  
Chemical Genomics Centre der Max-Planck-Gesellschaft  
Otto-Hahn-Straße 15, 44227 Dortmund (Deutschland)

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

[\*\*] Diese Arbeit wurde durch den Europäischen Forschungsrat im Zuge des siebten Rahmenprogramms der Europäischen Union (RP7/2007-2013) (ERC Grant Nr. 268309) gefördert. T.N.G. und J.S. danken den Fonds der Chemischen Industrie für finanzielle Unterstützung. P.M.C. dankt der Studienstiftung des Deutschen Volkes für seine Förderung. Wir danken N. Bleiming für Hilfe bei der Proteinexpression und -aufreinigung sowie für technische Unterstützung. Der Dortmund Protein Facility (DPF) gebührt Dank für Unterstützung bei Klonierungen sowie der Proteinexpression und -aufreinigung.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201308568> zu finden.



**Abbildung 1.** Helikale Wechselwirkungsmotive von Rab-Bindungspartnern. a) Kristallstrukturen von Rab-Proteinen und ihren nativen Liganden. Helices, die an der Wechselwirkung beteiligt sind und für weiterführende Modifikationen ausgewählt wurden, sind rot dargestellt. b) Synthetisierte Wildtyp-Peptide mit ihrem Ausgangsprotein, entsprechender Wechselwirkungsfläche und „Heatmap“-Darstellung der Dissoziationskonstanten mit verschiedenen nukleotidfreien Rab-Proteinen. \* Nukleotidfreie Rab-Proteine zeigen häufig eine schlechte Löslichkeit, was sich in relativ geringen Proteinendkonzentrationen äußert (maximale Konzentration im FP-Assay: Rab1b(NF) = 105  $\mu\text{M}$ , Rab5a(NF) = 4  $\mu\text{M}$ , Rab6a(NF) = 140  $\mu\text{M}$ , Rab7a(NF) = 57  $\mu\text{M}$ , Rab8a(NF) = 34  $\mu\text{M}$ , Rab9a(NF) = 5  $\mu\text{M}$ , Rab11a(NF) = 171  $\mu\text{M}$ ). Einige Bindungskurven erreichten kein Plateau und wurden daher extrapoliert, um vergleichbare  $K_d$ -Werte zu erhalten (für Details siehe Tabelle S4–S6 und Abbildung S7–S13).

Seitenkettenverbrückung („hydrocarbon peptide stapling“)<sup>[11]</sup> stabilisiert wurden.

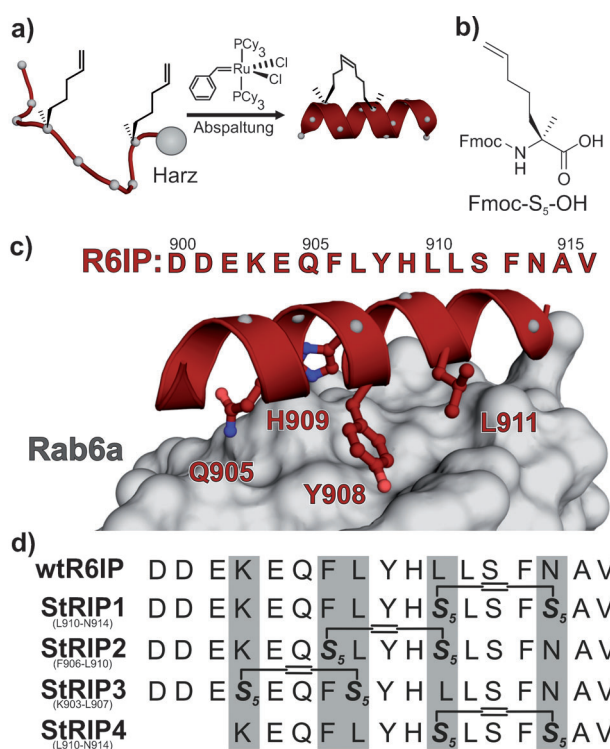
Auf der Suche nach Peptidsequenzen, die sich als Startpunkt für das Design von Inhibitoren für PPI von Rab-Proteinen eignen, analysierten wir bekannte Kristallstrukturen von Rab-Proteinen im Komplex mit ihren Bindungspartnern und suchten nach Fällen, in denen die Bindung an Rab im Wesentlichen durch  $\alpha$ -helikale Bindungsmotive vermittelt wird (Abbildung 1a und Abbildung S1).<sup>[3]</sup> Um abzuschätzen, ob die entsprechenden  $\alpha$ -helikalen Peptide weiterhin in ausreichendem Maße an Rab-Proteine binden können, berechneten wir ihre Wechselwirkungsfläche mit dem Rab-Protein auf der Basis der vorhandenen Strukturdaten. Mithilfe der Protein-Datenbank (<http://www.pdb.org>)<sup>[12]</sup> identifizierten wir neun Peptidkandidaten aus verschiedenen Effektor- und Regulationsproteinen, die eine Wechselwirkungsfläche von mindestens 600 Å<sup>2</sup> aufwiesen (Abbildung 1b und Tabelle S1).<sup>[13]</sup> Diese Peptide wurden mit Fmoc-basierter Festphasensynthese als N-terminale Fluorescein-PEG-Konjugate hergestellt (siehe Tabelle S2).

Da viele der Ausgangsproteine an mehrere Rab-GTPasen binden, untersuchten wir die Affinität der neun Peptide zu einer repräsentativen Auswahl an Rab-Proteinen (Rab1b/-5a/-6a/-7a/-8a/-9a/-11a) mithilfe von Fluoreszenzpolarisations(FP)-Messungen. Der Nukleotidbindungszustand der Rab-Proteine bestimmt in erheblichem Maße die Affinität zu den entsprechenden Bindungspartnern. So binden Effektorproteine, wie „Rab6-interacting protein 1“, LidA, Rabaptin5,

„Rab-interacting lysosomal protein“ und GCC185 bevorzugt an aktivierte, GTP-gebundene Rab-Proteine. GEFs, wie Rabin8, weisen hingegen die stärkste Affinität zum nukleotidfreien Bindungszustand auf, wohingegen das „Rab escort protein 1“ bevorzugt an die GDP-gebundene Form von Rab-Proteinen bindet. Daher wurden die ausgewählten Rab-Proteine in den drei Nukleotidbindungszuständen (GTP, GDP, nukleotidfrei) erzeugt und mittels FP untersucht. Außer im Fall von Rab6a,<sup>[14]</sup> das aufgrund einer außergewöhnlich niedrigen intrinsischen GTPase-Aktivität in der GTP-Form verbleibt, wurde das nichthydrolysierbare GTP-Analogon GppNHp eingesetzt, um die intrinsische Hydrolyse des Nukleotids zu vermeiden. Alle getesteten Peptide wiesen geringe Affinitäten (Dissoziationskonstanten:  $K_d > 300 \mu\text{M}$ ) zu nukleotidgebundenen Rab-Proteinen auf. Dieses Ergebnis ist nicht unerwartet, da kleine  $\alpha$ -helikale Fragmente ohne die stabilisierende Umgebung der Proteindomäne häufig ihre Sekundärstruktur verlieren. Allerdings zeigten vier der neun Peptide (wtR6IP, wtLidA2, wtRabin8 und wtREP) Dissoziationskonstanten zu nukleotidfreien Rab-Proteinen im niedrigen bis mittleren mikromolaren Bereich (Abbildung 1b und Tabelle S4–S6). Eine Diskriminierung zwischen verschiedenen Rab-Proteinen war dabei kaum festzustellen, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass die isolierten  $\alpha$ -helikalen Bindungs epitope lediglich einen Teil der ursprünglichen Wechselwirkungsfläche repräsentieren. Zudem zeichnen sich nukleotidfreie Rab-Proteine durch ein gesteigertes Maß an Flexibilität in der Nähe der Nukleotidbin-

ungstasche aus, was eine „Induced-fit“-Bindung erlauben könnte.

Aus den zahlreichen, etablierten Methoden zur Stabilisierung kleiner  $\alpha$ -helikaler Peptide entschieden wir uns für den Einsatz hydrophob verbrückter Seitenketten („hydrocarbon peptide stapling“), was sich in der Vergangenheit bereits als höchst erfolgreich für die Inhibition von PPIs erwiesen hat.<sup>[11]</sup> Dieses „peptide stapling“ erfordert den Einbau von  $\alpha$ -Methyl- $\alpha$ -alkenylaminosäuren in die Peptidsequenz und die anschließende Bildung eines Makrocyclus, um zwei Windungen einer  $\alpha$ -Helix durch eine vollständig hydrophobe Brücke miteinander zu verbinden. In der gängigsten Ausführung werden dabei zwei *S*-konfigurierte, modifizierte Aminosäuren an den Positionen *i* und *i* + 4 eingebracht und durch Olefinmetathese zu einer achtegliedrigen Brücke geschlossen (Abbildung 2a und b),<sup>[15]</sup> was potenziell zu einer Erhöhung der Affinität um bis zu zwei Größenordnungen führen kann. Die vier Peptide (wtR6IP, wtLidA2, wtRabin8 und wtREP) mit Affinitäten zu nukleotidfreien Rab-Proteinen im niedrigen mikromolaren Bereich wurden für die weitere Modifikation ausgewählt. Basierend auf den Kristallstrukturen des Ausgangsproteins in Komplex mit Rab, wurden für den Einbau der Verbrückung Reste identifiziert,



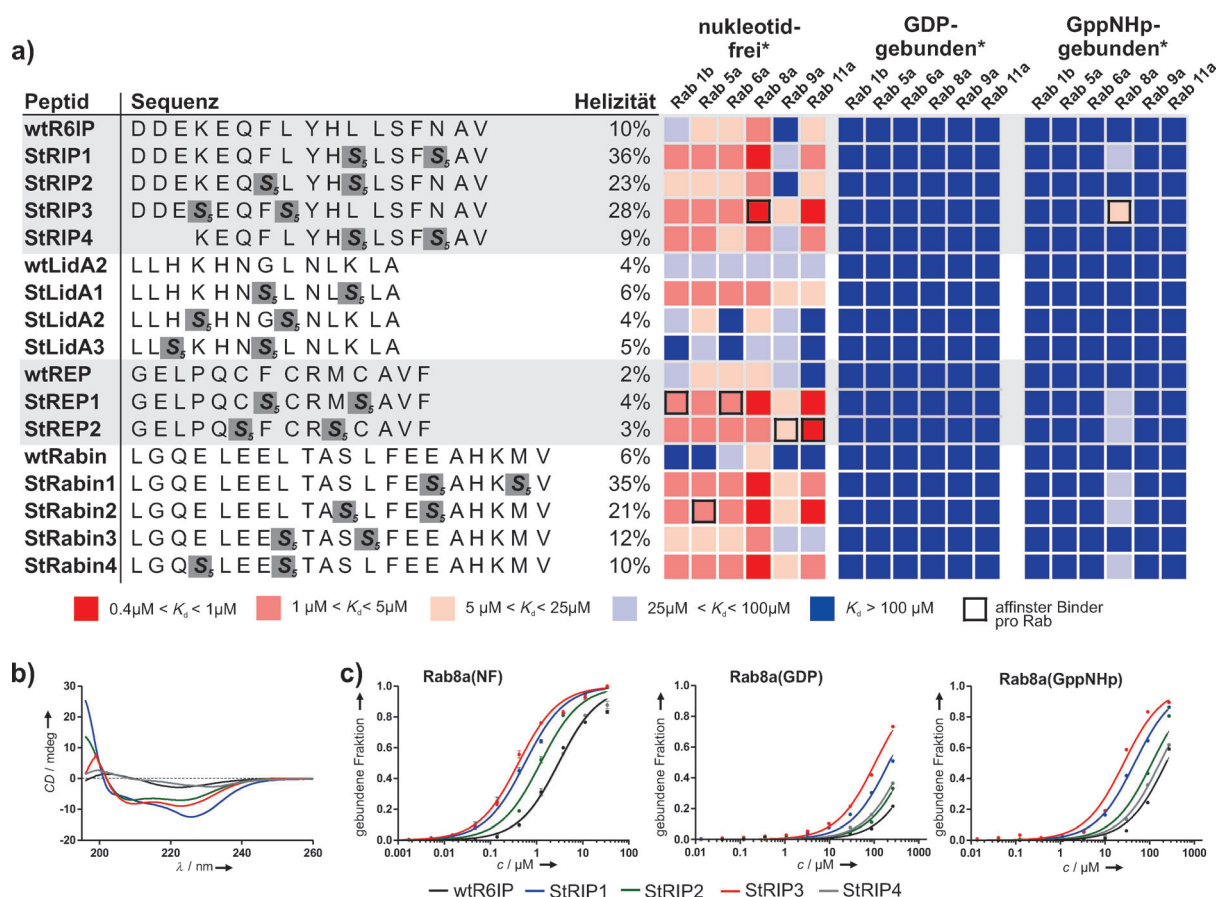
**Abbildung 2.** Design der von Rab6-interacting protein 1 abgeleiteten „stapled peptides“. a) Die „Peptide-stapling“-Strategie: Der  $\alpha$ -Methyl- $\alpha$ -alkenyl-Baustein Fmoc-S<sub>5</sub>-OH (siehe (b)) wird in die Peptidsequenz an den Positionen *i* und *i* + 4 eingebaut und durch Ringschluss-Olefinmetathese verknüpft. (Für detaillierte Informationen zur Baustein- und Peptidsynthese siehe Abbildung S5 und S6.) c) Kristallstruktur von Rab6-interacting protein 1 (R6IP), gebunden an Rab6a (PDB 3CWZ). An der Bindung beteiligte Seitenketten sind explizit dargestellt. Reste, die für den Einbau der unnatürlichen Aminosäure Fmoc-S<sub>5</sub>-OH ausgewählt wurden, sind grau hervorgehoben. d) Sequenzen der vier „stapled peptides“ die von R6IP abgeleitet wurden.

die nicht an der Bindung beteiligt sind. So wurden beispielsweise basierend auf dem Komplex von Rab6a(GTP) mit Rab6-interacting protein 1 fünf mögliche Modifikationsstellen ausgewählt (grau unterlegt in Abbildung 2d), was den Einbau von drei *i,i* + 4-Brücken ermöglicht (StRIP1-3). Zudem wurde ein kürzeres Peptid (StRIP4) synthetisiert, um den Einfluss des negativ geladenen N-Terminus zu untersuchen. Für den Einbau der *i,i* + 4-Verbrückung wurde die nichtnatürliche Aminosäure Fmoc-S<sub>5</sub>-OH (Fmoc-(*S*)-2-Amino-2-methylhept-6-ensäure; Abbildung 2b und Abbildung S5) während der Festphasensynthese in die Peptidsequenz integriert, und anschließend wurden die Seitenketten durch Ruthenium-katalysierte Olefinmetathese verknüpft. Abschließend wurde der N-Terminus der Peptide entweder wie oben beschrieben an einen Fluoreszenzfarbstoff gekuppelt oder mit Essigsäureanhydrid acetyliert (Tabelle S3).

In Analogie zu den stabilisierten Derivaten von wtR6IP, wurden weitere „stapled peptides“ ausgehend von wtLidA2, wtRabin8 und wtREP entworfen (Abbildung 3a und Abbildung S2–S4): drei „stapled peptides“ StLidA1-3 wurden auf Grundlage der Kristallstruktur von Rab8a(GppNHp)-LidA (PDB 3TNF) generiert. Basierend auf dem Komplex von Rab7(GDP)-Rab escort protein 1 (PDB 1VG0) wurden drei verschiedene Verbrückungsarchitekturen geplant. Davon waren jedoch nur zwei synthetisch zugänglich, wahrscheinlich aufgrund der Helix-brechenden Eigenschaften von Prolin 381. Im Fall der etwas längeren wtRabin-Sequenz wurden vier verschiedene modifizierte Peptide (StRabin1-4) basierend auf der Kristallstruktur des Rab8(NF)-Rabin8-Komplexes (PDB 4HLX) synthetisiert. Anschließend wurden alle „stapled peptides“ mit Circular Dichroismus (CD)-Spektroskopie untersucht. In den meisten Fällen war eine erhöhte  $\alpha$ -Helizität im Vergleich zu den nichtmodifizierten Startsequenzen zu beobachten, wobei StRIP1 (36 %) und StRabin1 (35 %) die größte  $\alpha$ -Helizität aufwiesen (Abbildung 3a und b, Tabelle S8 und Abbildung S32).<sup>[16]</sup>

Die Affinitäten der Fluorescein-markierten Peptide wurden für Rab1b/-5a/-6a/-8a/-9a/-11a jeweils in den drei Nukleotidzuständen mithilfe von FP bestimmt (Abbildung 3a und c; Tabelle S6 und Abbildung S14–S31). Für die nukleotidfreien Rab-Proteine zeigten nahezu alle stabilisierten Analoga eine erhöhte Bindungsaffinität im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyp-Peptiden (bis zu 200-fach). Lediglich für die stabilisierten Peptide StLidA2 (für Rab9a(NF) und Rab11a(NF)) und StLidA3 (für alle getesteten Rab(NF) Proteine) konnte keine verbesserte Affinität beobachtet werden. Für Rab8a(NF) und Rab11a(NF) konnten einige Liganden mit einer Dissoziationskonstanten im submikromolaren Bereich identifiziert werden, wobei StRIP3/Rab11 [*K*<sub>d</sub> = (0.40 ± 0.02)  $\mu$ M] und StREP2/Rab8a [*K*<sub>d</sub> = (0.42 ± 0.03)  $\mu$ M] die höchsten Affinitäten aufweisen. Die Dissoziationskonstanten der besten Binder für Rab1b, -5a und -6a in ihrer nukleotidfreien Form liegen zwischen 1.0  $\mu$ M und 1.1  $\mu$ M. Dabei konnte ein bis zu 40-facher Affinitätszuwachs als Ergebnis der Verbrückung beobachtet werden. Lediglich für Rab9(NF) wurden *K*<sub>d</sub>-Werte über 10  $\mu$ M bestimmt. Analog zu den Wildtyp-Sequenzen zeigen die untersuchten „stapled peptides“ eine geringe Selektivität zwischen den verschiedenen Rab-Proteinen. Zudem haben die Peptide eine geringe





**Abbildung 3.** Evaluierung der „stapled peptides“: a) Sequenzen der modifizierten Peptide,  $\alpha$ -Helizität und eine „Heatmap“-Darstellung der Dissoziationskonstanten der FITC-markierten Peptide mit verschiedenen Rab-Proteinen in allen drei Nukleotidbindungs Zuständen. \* Die maximalen eingesetzten Protein Konzentrationen waren:  $c_{\text{max}}[\text{Rab1b}(\text{NF})] = 110 \mu\text{M}$ ,  $c_{\text{max}}[\text{Rab5a}(\text{NF})] = 5 \mu\text{M}$ ,  $c_{\text{max}}[\text{Rab6a}(\text{NF})] = 100 \mu\text{M}$ ,  $c_{\text{max}}[\text{Rab8a}(\text{NF})] = 34 \mu\text{M}$ ,  $c_{\text{max}}[\text{Rab9a}(\text{NF})] = 68 \mu\text{M}$  und  $c_{\text{max}}[\text{Rab11a}(\text{NF})] = 170 \mu\text{M}$ ; die nukleotidfreien Proteine wurden nahe ihrer Löslichkeitsgrenze eingesetzt;  $c_{\text{max}}[\text{Rab}(\text{GDP})] = 300 \mu\text{M}$  und  $c_{\text{max}}[\text{Rab}(\text{GppNHp})] = 300 \mu\text{M}$ . FP-Daten, eine explizite Auflistung der Dissoziationskonstanten, sowie detaillierte Informationen über die CD- und  $K_d$ -Berechnungen befinden sich in Tabelle S6 und Abbildung S14–S31. b) Repräsentatives CD-Spektrum der acetylierten StRIP-Peptide. c) Repräsentative FP-Bindungsdaten der FITC-markierten StRIP-Peptide mit Rab8a.

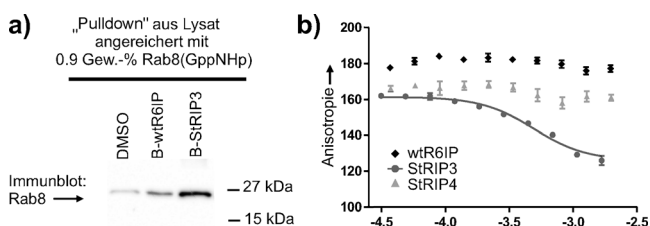
Affinität ( $K_d > 100 \mu\text{M}$ ) gegenüber den GDP-gebundenen und den meisten GTP-/GppNHp-gebundenen Rab-Proteinen, was die geringen Affinitäten der Wildtyp-Sequenzen widerspiegelt. Allerdings binden einige Peptide Rab8a in der GppNHp-gebundenen Form. Dabei haben sechs „stapled peptides“ eine moderate Affinität mit  $K_d$ -Werten zwischen  $50 \mu\text{M}$  bis  $100 \mu\text{M}$ . Besonders bemerkenswert ist die stabilisierte  $\alpha$ -helikale Domäne von Rab6-interacting protein 1, StRIP3, die Rab8a(GppNHp) mit  $K_d = (22.2 \pm 1.2) \mu\text{M}$  bindet, was in dem Bereich von einigen natürlichen Effektorproteinen liegt.<sup>[17, 18]</sup> Zudem zeigt StRIP3 eine mindestens 5-fache Selektivität für Rab8a(GppNHp) gegenüber allen anderen getesteten Rab-Proteinen. Damit ist StRIP3 der erste Binder einer Rab-GTPase in ihrer aktivierten, GTP-gebundenen Form im niedrigen mikromolaren Bereich.

Um die Einflüsse der hydrophoben Verbrückung näher zu untersuchen, wurden StRIP3-Derivate mit längerer und kürzerer Brücke synthetisiert. Dies führte zu Peptiden mit reduzierter Affinität für Rab8(GppNHp) (Abbildung S33 und S34). Zusätzlich wurde die StRIP3 Wildtyp-Sequenz (wtR6IP) mithilfe eines N-terminalen kovalenten H-Brü-

cken-Ersatzes („hydrogen bond surrogate“, HBS) stabilisiert.<sup>[19]</sup> Die derart modifizierte Helix zeigte zwar eine doppelt so hohe Affinität wie die Wildtypsequenz wtR6IP, konnte jedoch nicht den 9-fachen Affinitätsgewinn von StRIP3 erreichen (siehe Abbildung S32 und S34). Zusätzlich wurde die zentrale Aminosäuresequenz variiert. Dafür wurde Leucin 911 (Abbildung 2c) durch Aminosäuren mit unterschiedlichem sterischen Anspruch und unterschiedlicher Polarität ersetzt (Abbildung S33 und S34). Diese Modifikationen lieferten jedoch keine Peptide mit signifikant erhöhter Affinität.

Für biologisch aktive Verbindungen ist es wichtig, dass sie ihr Zielprotein auch in einer komplexen Proteinmischung gezielt binden können. Deshalb wurde für den besten Binder, StRIP3, untersucht, ob er in der Lage ist, Rab8 in Zelllysate zu binden. Um dies zu testen, wurde ein Präzipitationsversuch mit HCT116-Lysat durchgeführt, welches mit 0.9 Gew.-% Rab8a(GppNHp) (bezogen auf die Proteinmenge) angereichert wurde. Dafür wurde das stabilisierte Peptid StRIP3 und der schwächere Ligand wtR6IP mit Biotin markiert und auf Streptavidin-modifizierten Kügelchen immobilisiert. Anschließend wurden die Kügelchen mit Rab8a(GppNHp) an-

gereichertem Zelllysat inkubiert. Eine Western-Blot-Analyse mithilfe eines Rab8a spezifischen Antikörpers zeigte klar, dass die Präzipitationseffizienz gut mit den im FP-Experiment bestimmten Bindungsaffinitäten korreliert (Abbildung 4a). Um die funktionale Aktivität von StRIP3 zu



**Abbildung 4.** In-vitro-Charakterisierung von StRIP3. a) „Pull-down“-Experiment mit biotinyliertem Peptid in angereichertem HCT116-Lysat. b) Verdrängungskurve von Fluorescein-markierten OCRL1<sub>539-901</sub> (50 nM) von Rab8a(GppNHp) (10 μM) mit steigenden Konzentrationen an acetyliertem StRIP3.

überprüfen, wurde die Verdrängung einer Rab8-Effektor-Bindung untersucht und dazu der Rab8-Effektor „oculocerebrorenale syndrome of Lowe protein“ (OCRL1), ein peripheres Membranprotein, welches hauptsächlich am Golgi-Apparat lokalisiert ist, für weitere Experimente ausgewählt. Mutationen von OCRL1 stehen im Zusammenhang mit dem Ausbruch und dem Fortschreiten des Lowe-Syndroms.<sup>[20]</sup> Die Rab8 Bindungsdomäne von OCRL1 (Aminosäure 539–901) wurde mit N-Hydroxysuccinimid-Fluorescein markiert und die Bindung an Rab8a(GppNHp) mithilfe von FP überprüft. Die beobachtete Dissoziationskonstante von 1.7 μM für OCRL1<sub>539-901</sub> und Rab8a(GppNHp) korreliert dabei gut mit der publizierten Affinität<sup>[17]</sup> ( $K_d = 0.9 \mu\text{M}$ ) für nichtmodifiziertes OCRL1<sub>539-901</sub>. Um die Fähigkeit von StRIP3 zur Störung dieser Wechselwirkung zu überprüfen, wurde ein FP-Verdrängungsexperiment durchgeführt. In diesem Experiment konnte die konzentrationsabhängige Verdrängung von markiertem OCRL1<sub>539-901</sub> mithilfe von acetyliertem StRIP3 gezeigt werden. Die acetylierten Kontrollpeptide StRIP4 und wtR6IP haben hingegen keinen Einfluss auf die Rab8a-(GppNHp)-OCRL1<sub>539-901</sub>-Bindung (Abbildung 4b).

Für die Inhibition der Rab8a(GppNHp)-OCRL1<sub>539-901</sub> Komplexbildung mithilfe von StRIP3 wurde eine  $IC_{50}$  von  $(490 \pm 65) \mu\text{M}$  bestimmt. Die aus diesem Experiment erhaltene Titrationskurve kann dabei mit einem rein kompetitiven Bindungsmodell und einem angenommenen  $K_d$  von 45 μM für das StRIP3-Peptid gut erklärt werden. Eine Simulation der Bindungskurve mithilfe des Computerprogramms Scientist (Micromath) ergab eine berechnete  $IC_{50}$  von ungefähr 0.5 mM, welche gut mit den experimentellen Daten übereinstimmt. Obwohl der  $K_d$ -Wert etwa doppelt so hoch ist wie bei direkter Titration des Peptids mit Rab8a, stimmt der Wert trotz der unterschiedlichen verwendeten Methoden gut überein und kann daher als Hinweis auf eine direkte kompetitive Inhibition der Bindung des Effektors OCRL1 an Rab8a durch StRIP3 gesehen werden. Eine intensivere Analyse wäre jedoch nötig um den exakten Bindungsmodus

zu ermitteln (z.B. ob die Bindung rein oder möglicherweise teilweise kompetitiv ist).

Die Wechselwirkungsflächen zwischen Rab-GTPasen und ihren Bindungspartnern sind zumeist ausgedehnt und gering profiliert und verhindern so die Anwendung klassischer Inhibitionsansätze. Aufgrund ihrer Beteiligung an der Entstehung und Entwicklung verschiedener humaner Erkrankungen werden Rab-GTPasen als neue therapeutische Zielproteine angesehen. Nichtsdestotrotz sind bisher keine Verbindungen bekannt, die Rab-Proteine direkt binden und ihre PPIs modulieren können. Hier beschreiben wir eine Methode, PPIs von Rab-GTPasen mithilfe hydrophob-verbrückter Peptide („hydrocarbon stapled peptides“) erfolgreich zu inhibieren. Dazu wurde eine Reihe von α-helikalen Bindungsmotiven identifiziert, stabilisiert und in Bezug auf die Bindung von Rab-Proteinen untersucht. Der Einbau der hydrophoben Verbrückung in die α-helikalen Bindungsmotive erhöht dabei die Affinität der Peptidliganden für Rab-Proteine in nahezu allen untersuchten Beispielen. Dies führte in einem Fall zu einer 200-fach höheren Bindungsaffinität im Vergleich mit dem Ursprungspeptid. Das am stärksten bindende Peptid hat einen  $K_d$  von 0.4 μM und bindet Rab-Proteine in ihrer nukleotidfreien Form. Bemerkenswerter Weise konnte ein Peptid (StRIP3) identifiziert werden, welches selektiv an Rab8a in seiner aktiven, GppNHp gebundenen Form bindet und eine zu Rab-Effektorproteinen vergleichbare Affinität aufweist. StRIP3 zeigt funktionelle Aktivität in vitro durch die Inhibition einer Rab8a-Effektor-Wechselwirkung. Dieses Peptid stellt die erste synthetische Verbindung dar, die direkt an Rab-GTPasen bindet und eine Rab-Protein-Wechselwirkung blockieren kann. Angesichts der Tatsache, dass sich die Bindung an kleine GTPasen für die Modulation von Effektor-Bindungen als extrem schwierig erwiesen hat, kann unsere Strategie einen neuen Weg für das erfolgreiche Überwinden dieses Hindernisses darstellen.

Eingegangen am 1. Oktober 2013,  
veränderte Fassung am 26. November 2013  
Online veröffentlicht am 31. Januar 2014

**Stichwörter:** Inhibitoren · Kleine GTPase · Protein-Protein-Wechselwirkung · Rab-Protein · Verbrückte Peptide

- [1] a) H. R. Bourne, D. A. Sanders, F. McCormick, *Nature* **1990**, 348, 125–132; b) J. Cherfils, M. Zeghouf, *Physiol. Rev.* **2013**, 93, 269–309.
- [2] A. Itzen, R. S. Goody, *Semin. Cell Dev. Biol.* **2011**, 22, 48–56.
- [3] A. H. Hutagalung, P. J. Novick, *Physiol. Rev.* **2011**, 91, 119–149.
- [4] a) R. S. Bon, Z. Guo, E. A. Stigter, S. Wetzel, S. Menninger, A. Wolf, A. Choidas, K. Alexandrov, W. Blankenfeldt, R. S. Goody, et al., *Angew. Chem.* **2011**, 123, 5059–5063; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 4957–4961; b) N. Berndt, A. D. Hamilton, S. M. Sebt, *Nat. Rev. Cancer* **2011**, 11, 775–791; c) E. A. Stigter, Z. Guo, R. S. Bon, Y.-W. Wu, A. Choidas, A. Wolf, S. Menninger, H. Waldmann, W. Blankenfeldt, R. S. Goody, *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 8330–8340; d) G. Zimmermann, B. Papke, S. Ismail, N. Vartak, A. Chandra, M. Hoffmann, S. A. Hahn, G. Triola, A. Wittinghofer, P. I. H. Bastiaens, et al., *Nature* **2013**, 497, 638–642.

- [5] a) S. Mitra, K. W. Cheng, G. B. Mills, *Semin. Cell Dev. Biol.* **2011**, *22*, 57–68; b) J. O. Agola, P. A. Jim, H. H. Ward, S. Basuray, A. Wandinger-Ness, *Clin. Genet.* **2011**, *80*, 305–318.
- [6] G. L. Verdine, L. D. Walensky, *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 7264–7270.
- [7] a) L. Renault, B. Guibert, J. Cherfils, *Nature* **2003**, *426*, 525–530; b) M. Hafner, A. Schmitz, I. Grüne, S. G. Srivatsan, B. Paul, W. Kolanus, T. Quast, E. Kremmer, I. Bauer, M. Famulok, *Nature* **2006**, *444*, 941–944; c) Q. Zhang, M. B. Major, S. Takanashi, N. D. Camp, N. Nishiya, E. C. Peters, M. H. Ginsberg, X. Jian, P. A. Randazzo, P. G. Schultz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 7444–7448; d) J. Viaud, M. Zeghouf, H. Barelli, J.-C. Zeeh, A. Padilla, B. Guibert, P. Chardin, C. A. Royer, J. Cherfils, A. Chavanieu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 10370–10375; e) L. Hong, S. R. Kenney, G. K. Phillips, D. Simpson, C. E. Schroeder, J. Noth, E. Romero, S. Swanson, A. Waller, J. J. Strouse, et al., *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 8531–8543.
- [8] a) C. Herrmann, C. Block, C. Geisen, K. Haas, C. Weber, G. Winde, T. Mörröy, O. Müller, *Oncogene* **1998**, *17*, 1769–1776; b) J. Kato-Stankiewicz, I. Hakimi, G. Zhi, J. Zhang, I. Serebriiskii, L. Guo, H. Edamatsu, H. Koide, S. Menon, R. Eckl, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 14398–14403; c) P. C. Garreiss, A. R. Schneekloth, M. J. Salcius, S.-Y. Seo, C. M. Crews, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 517–522; d) I. C. Rosnizeck, M. Spornier, T. Harsch, S. Kreitner, D. Filchtinski, C. Herrmann, D. Engel, B. König, H. R. Kalbitzer, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 10799–10804; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10647–10651; e) F. Shima, Y. Yoshikawa, M. Ye, M. Araki, S. Matsumoto, J. Liao, L. Hu, T. Sugimoto, Y. Ijiri, A. Takeda, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 8182–8187.
- [9] a) A. K. Ganguly, Y.-S. Wang, B. N. Pramanik, R. J. Doll, M. E. Snow, A. G. Taveras, S. Remiszewski, D. Cesarz, J. del Rosario, B. Vibulbhan, et al., *Biochemistry* **1998**, *37*, 15631–15637; b) A. Patgiri, K. K. Yadav, P. S. Arora, D. Bar-Sagi, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 585–587; c) Q. Sun, J. P. Burke, J. Phan, M. C. Burns, E. T. Olejniczak, A. G. Waterson, T. Lee, O. W. Rossanese, S. W. Fesik, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 6244–6247; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6140–6143; d) T. Maurer, L. S. Garrenton, A. Oh, K. Pitts, D. J. Anderson, N. J. Skelton, B. P. Fauber, B. Pan, S. Malek, D. Stokoe, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 5299–5304.
- [10] a) J. Garner, M. M. Harding, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 3577–3585; b) L. K. Henchey, A. L. Jochim, P. S. Arora, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 692–697; c) M. Raj, B. N. Bullock, P. S. Arora, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 4051–4057; d) R. Dhara-nipragada, *Future Med. Chem.* **2013**, *5*, 831–849; e) V. Azzarito, K. Long, N. S. Murphy, A. J. Wilson, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 161–173.
- [11] a) C. E. Schafmeister, J. Po, G. L. Verdine, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5891–5892; b) L. D. Walensky, A. L. Kung, I. Escher, T. J. Malia, S. Barbuto, R. D. Wright, G. Wagner, G. L. Verdine, S. J. Korsmeyer, *Science* **2004**, *305*, 1466–1470; c) E. Gavathiotis, M. Suzuki, M. L. Davis, K. Pitter, G. H. Bird, S. G. Katz, H.-C. Tu, H. Kim, E. H.-Y. Cheng, N. Tjandra, et al., *Nature* **2008**, *455*, 1076–1081; d) R. E. Moellering, M. Cornejo, T. N. Davis, C. D. Bianco, J. C. Aster, S. C. Blacklow, A. L. Kung, D. G. Gilliland, G. L. Verdine, J. E. Bradner, *Nature* **2009**, *462*, 182–188; e) G. H. Bird, N. Madani, A. F. Perry, A. M. Princiotta, J. G. Supko, X. He, E. Gavathiotis, J. G. Sodroski, L. D. Walensky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 14093–14098; f) M. L. Stewart, E. Fire, A. E. Keating, L. D. Walensky, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 595–601; g) T. N. Grossmann, J. T.-H. Yeh, B. R. Bowman, Q. Chu, R. E. Moellering, G. L. Verdine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 17942–17947; h) Y. S. Chang, B. Graves, V. Guerlavais, C. Tovar, K. Packman, K.-H. To, K. A. Olson, K. Kesavan, P. Gangurde, A. Mukherjee, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, E3445–E3454; i) W. Kim, G. H. Bird, T. Neff, G. Guo, M. A. Kerenyi, L. D. Walensky, S. H. Orkin, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 643–650.
- [12] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235–242.
- [13] M. F. Sanner, A. J. Olson, J.-C. Spehner, *Biopolymers* **1996**, *38*, 305–320.
- [14] T. Bergbrede, O. Pylypenko, A. Rak, K. Alexandrov, *J. Struct. Biol.* **2005**, *152*, 235–238.
- [15] Y.-W. Kim, T. N. Grossmann, G. L. Verdine, *Nat. Protoc.* **2011**, *6*, 761–771.
- [16] Eine Verlängerung der synthetisierten Helix sollte die Helizität und die Affinität verbessern, wie für StRIP4/StRIP1 (Abbildung 3a) und StRabin1/StRabin1 XL (Tabelle S9) beobachtet. StRIP3, StLidA und StREP enthalten allerdings bereits die vollständige helikale Bindungsdomäne gemäß der entsprechenden Kristallstrukturen (PDB: 3CWZ, 3TNF bzw. 1VG0).
- [17] A. S. Burguete, T. D. Fenn, A. T. Brunger, S. R. Pfeffer, *Cell* **2008**, *132*, 286–298.
- [18] X. Hou, N. Hagemann, S. Schoebel, W. Blankenfeldt, R. S. Goody, K. S. Erdmann, A. Itzen, *EMBO J.* **2011**, *30*, 1659–1670.
- [19] A. Patgiri, A. L. Jochim, P. S. Arora, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1289–1300.
- [20] O. Attree, I. M. Olivos, I. Okabe, L. C. Bailey, D. L. Nelson, R. A. Lewis, R. R. McInnes, R. L. Nussbaum, *Nature* **1992**, *358*, 239–242.