

## Protein-Protein-Wechselwirkungen

Deutsche Ausgabe: DOI: 10.1002/ange.201601299  
Internationale Ausgabe: DOI: 10.1002/anie.201601299Eintopf-N2C/C2C/N2N-Proteinligationsstrategien zur Analyse schwacher Protein-Protein-Wechselwirkungen

Lei Zhao, Christiane Ehrh, Oliver Koch und Yao-Wen Wu\*

**Abstract:** Schwache Protein-Protein-Wechselwirkungen sind von zentraler Bedeutung für die Dynamik der Zelle. Leider verhindern geringe Halbwertszeiten eine zufriedenstellende Charakterisierung dieser Komplexe. Die von uns etablierte, leicht umsetzbare und hochspezifische Methode ermöglicht die Erzeugung stabiler Komplexe durch kovalente Verknüpfung räumlich benachbarter Proteintermini. Um das Spektrum möglicher Ligationsreaktionen zu erweitern, wurden drei Strategien angewendet: die bereits etablierte native chemische Ligation (N-zu-C-Terminus, N2C), sowie die Ligation der C-Termini (C-zu-C-Terminus, C2C) oder N-Termini (N-zu-N-Terminus, N2N) der wechselwirkenden Proteine in einem Reaktionsansatz. Für die schwache Wechselwirkung zwischen Ypt1 und GDI konnte dabei eine Präferenz für die C2C-Ligation beobachtet werden ( $t_{1/2} = 4.8$  min, annähernd quantitative Umsetzung). Analysen des Ypt1-GDI-Addukts ergeben, dass die Wechselwirkung mit der Ypt1-G-Domäne das Öffnen der Lipidbindetasche von GDI induziert und die Bindung einer Prenyleinheit ermöglicht. Diese Untersuchungen liefern somit Einblicke in das Rab-vermittelte Membranrecycling. Der Einsatz der Ligationsstrategie für das transiente KRas-Homodimer unterstreicht ihre allgemeine Anwendbarkeit.

**P**rotein-Protein-Wechselwirkungen (PPIs) sind für zahlreiche zelluläre Vorgänge von fundamentaler Bedeutung,<sup>[1]</sup> wobei dynamische Netzwerke von PPIs verschiedenste zelluläre Prozesse verknüpfen.<sup>[2]</sup> In Abhängigkeit von der Halbwertszeit dieser Komplexe werden zwei Formen unterschieden: stabile und transiente Protein-Protein-Komplexe.<sup>[3]</sup> Häufig wird die Regulation innerhalb einer Zelle durch transiente PPIs realisiert, beispielsweise in Signaltransduktionsketten oder im Zellzyklus. Diese PPIs zeigen in der Regel schwache Wechselwirkungen mit Dissoziationskonstanten im oberen mikromolaren Bereich und Halbwertszeiten von Sekunden bis hin zu Minuten.<sup>[4]</sup> Eine Untersuchung dieser schwachen PPIs ist daher unerlässlich für das Verständnis von Signalnetzwerken und für die Entwicklung therapeutisch wirksamer PPI-Inhibitoren.<sup>[5]</sup> Die Detektion und

zuverlässige Analyse dieser Komplexe stellen dennoch weiterhin große Herausforderungen dar.<sup>[6]</sup>


Chemische Vernetzung und die Erzeugung von Fusionsproteinen sind zwei klassische Herangehensweisen zur Analyse schwacher PPIs.<sup>[7]</sup> Die kovalente Verknüpfung wechselwirkender Proteine durch bifunktionelle Reagenzien oder über Disulfidbrücken<sup>[8]</sup> erfordert aber Kenntnisse über die an der PPI beteiligten Proteinreste, die häufig nur durch Mutageneseexperimente zugänglich sind. Weiterhin gehen die verwendeten Reagenzien häufig unspezifische Reaktionen mit Amin- oder Thiofunktionaltäten der Proteine ein, die zu Oligomerisierungen führen.<sup>[9]</sup> Eine Alternative ist daher die Herstellung von Fusionsproteinen durch Glycin-reiche Linker, wobei diese Methode keinen Aufschluss über die Orientierung der Proteine im Komplex liefert. Eine Optimierung der Linkerlängen ist unumgänglich, um eine Beeinträchtigung der nativen PPI zu vermeiden,<sup>[10]</sup> wobei die Kenntnis der Struktur mindestens eines Partners sowie der Natur der Wechselwirkung essentielle Voraussetzungen sind. Die Entwicklung selektiver und unkomplizierter Methoden zur Analyse schwacher Protein-Protein-Komplexe ist daher unerlässlich.

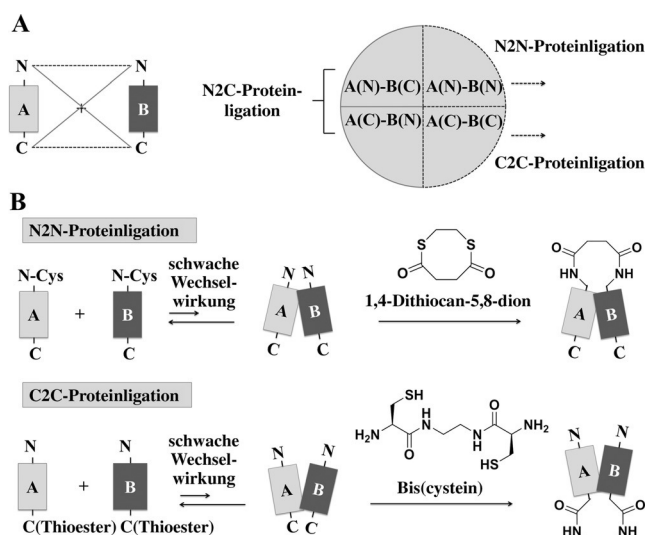
NCL („native chemical ligation“) und EPL („expressed protein ligation“) sind wirkungsvolle Techniken der Proteinsynthese.<sup>[11]</sup> Die Annahme, dass schwache PPIs die Wahrscheinlichkeit einer Wechselwirkung der Proteintermini erhöhen und eine chemische Proteinligation ermöglichen könnten, war wegweisend für die Entwicklung einer Ligationsstrategie, die schwache Proteinkomplexe gezielt und spezifisch stabilisiert. Es bestehen vier Möglichkeiten der Verknüpfung der Proteintermini, wobei die gängige N2C-Ligation nur die Hälfte aller denkbaren Szenarien abdeckt (Schema 1 A). Um das gesamte Spektrum der chemischen Proteinligation auszunutzen, haben wir daher neuartige C2C- und N2N-Ligationsreaktionen etabliert (Schema 1 B).

Rab-GTPasen sind essentieller Bestandteil des vesikulären Transportsystems intrazellulärer Membranen.<sup>[12]</sup> Das zur Rab-GTPase aus Säugetieren homologe Protein in Hefe ist Ypt („yeast protein transport“). Rab-Proteine assoziieren in prenylierter Form mit Membranen. Innerhalb des Rab-Zyklus rekrutiert GDI („GDP dissociation inhibitor“) prenyliertes GDP-gebundenes Rab von der Membran. Während GDI das unprenylierte Protein nur schwach bindet (mikromolare Dissoziationskonstanten), bindet es prenyliertes Rab mit Dissoziationskonstanten im nanomolaren Bereich. Dieser Unterschied in der freien Energie der Bindung ist die Triebkraft der GDI-vermittelten Rab-Extraktion aus Membranen.<sup>[13]</sup> Der Mechanismus dieses Prozesses ist aufgrund der transienten Natur der Bindung zwischen unprenyliertem Rab und GDI bisher nicht aufgeklärt worden. Hier

[\*] Dr. L. Zhao, Dr. Y.-W. Wu  
Chemical Genomics Center der Max-Planck-Gesellschaft  
Otto-Hahn-Straße 15, 44227 Dortmund (Deutschland)  
E-Mail: yaowen.wu@mpi-dortmund.mpg.de

C. Ehrh, Dr. O. Koch  
Technische Universität Dortmund  
Fakultät für Chemie und Chemische Biologie  
Otto-Hahn-Straße 6, 44227 Dortmund (Deutschland)

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind unter:  
<http://dx.doi.org/10.1002/ange.201601299> zu finden.



**Schema 1.** A) Mögliche Ligationsstrategien. B) Strategien zur Erzeugung von N2N- und C2C-verknüpften Komplexen.

präsentieren wir Ansätze zur chemischen N2C-, N2N- und C2C-Ligation, die eine Untersuchung dieses schwachen Komplexes ermöglichen.

Zur N2N- und C2C-Proteinligation ist es notwendig, eine Thioester- bzw. 1,2-Aminothiol-Funktionalität am N- bzw. C-Terminus der Proteine einzuführen. Dazu wurden die bifunktionellen Moleküle 1,4-Dithioan-5,8-dion (DT) und Biscystein (BC) synthetisiert (siehe Schema 1B und die Hintergrundinformationen). Ypt1-Thioester, GDI-Thioester, N-Cys-Ypt1 und N-Cys-GDI wurden mittels Inteinchemie und TEV-Protease-Verdau erzeugt („Tobacco Etch Virus“; Abbildungen S1, S2).<sup>[14]</sup> Um die aminoterminal Thioestergruppe einzuführen (N-Thioester-GDI), wurden 1–3 mM DT mit 100–300  $\mu$ M N-Cys-GDI inkubiert, wobei eine Umsetzung von 99% beobachtet werden konnte (Abbildungen S3, S4). Die Einführung der 1,2-Aminothiol-Gruppe (Ypt1-BC oder GDI-BC) erfolgte in einer annähernd quantitativen Reaktion von 1–3 mM BC mit 100–300  $\mu$ M Ypt1-Thioester oder GDI-Thioester (Abbildungen S3, S4). Die effizienteste Ligationstrategie zur kovalenten Verknüpfung des schwachen Ypt1-GDI-Komplexes wurde anhand einer Eintopfreaktion ermittelt (Tabelle 1). Zwei Ypt1-Derivate (Ypt1-Thioester, N-Cys-Ypt1) und vier GDI-Spezies (GDI-Thioester, GDI-BC,

N-Cys-GDI, N-Thioester-GDI) wurden in gleichen molaren Verhältnissen gemischt. MALDI-TOF und SDS-PAGE Analysen ermöglichten eine zuverlässige Detektion des kovalenten Proteinkomplexes (Abbildungen S5, S6).

Die vier Ligationstrategien wurden im Anschluss an diese vielversprechenden Ergebnisse einzeln durchgeführt. Hohe Proteinkonzentrationen (100–300  $\mu$ M) oberhalb des  $K_d$ -Wertes von 37.3  $\mu$ M (Abbildung S7) wurden angewendet, um die schwache PPI zur Ligation auszunutzen. Hohe Reaktionsgeschwindigkeiten ( $t_{1/2}$  ca. 5 min) und annähernd quantitative Umsetzung konnten ausschließlich für die C2C-Ligationstrategie beobachtet werden (Abbildungen 1A, S8). Dem gegenüber stehen niedrige N2C-Ligationsgeschwindigkeiten mit geringen Ausbeuten (< 50%) (Abbildungen 1A, S9). Obwohl N-Thioester-GDI gut mit Cystein reagiert, führte die N2N-Ligationstrategie zu keinen Produkten (Abbildungen S4C, S9). Somit kann geschlossen werden, dass die schwache Ypt1-GDI-Bindung zur Orientierung der Termini führt, die für verschiedene Ligationstrategien unterschiedliche Ausbeuten und Reaktionsgeschwindigkeiten zur Folge hat (Tabelle 1). Im Fall von Ypt1 und GDI ermöglicht die räumliche Nähe der Carboxytermini eine effiziente C2C-Ligation, die eine quantitative Synthese des kovalenten Ypt1-GDI-Konstrukts ermöglicht (Schema S1, Abbildung S10). Falls die Proteintermini bei Komplexbildung nicht in räumliche Nähe gelangen, könnte die gentechnische Einführung eines geeigneten Linkers (z.B. GGS-Repeat) dennoch zur erfolgreichen Ligation führen, deren Resultat mithilfe einer Eintopfreaktion überprüfbar ist.

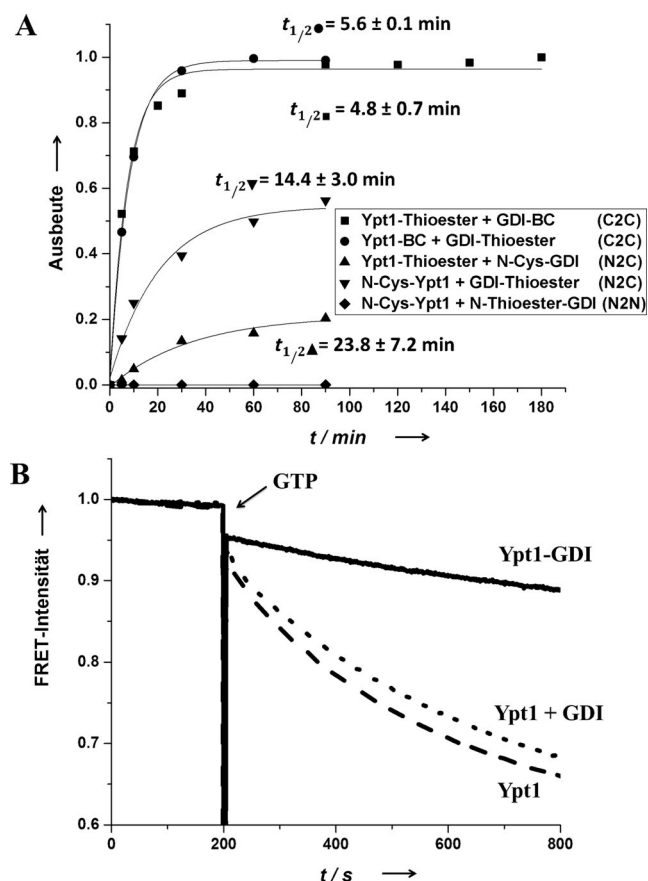
Die Effizienz der verschiedenen Ligationsansätze steht in Einklang mit der Kristallstruktur des prenylierten Ypt1-GDI-Komplexes.<sup>[15]</sup> Der GDI-N-Terminus befindet sich nicht in räumlicher Nähe beider Ypt1-Termini (Abbildung S11). Folglich blieben die N2N- (Ypt1-n-n-GDI) und N2C- (n-Ypt1-n-GDI) Ligationstrategien erfolglos. Dagegen liegt der C-Terminus von GDI benachbart zu beiden Ypt1-Termini (Abbildung S11). Der letzte carboxyterminale Rest GDI<sup>Q446</sup> ist ca. 22 Å bzw. 17 Å vom letzten aminoterminalen Rest Ypt1<sup>S3</sup> bzw. carboxyterminalen Rest Ypt1<sup>L193</sup> entfernt. Die bezüglich des Wechselwirkungsmotivs aus V<sup>191</sup> und L<sup>193</sup> weiter carboxyterminal gelegenen Reste sind äußerst flexibel.<sup>[16]</sup> Aufgrund dieser Beobachtungen wurden die Produkte der N2C- und C2C-Ligationen mit kovalent verknüpften Termini basierend auf der initialen Kristallstruktur des Komplexes

zwischen Ypt1 und GDI (PDB-Code: 2BCG) MD-Simulationen unterzogen. Während das Linkerpeptid des n-GDI-n-Ypt1-Komplexes konformativ eingeschränkt ist, weist das des n-Ypt1-GDI-n-Adduktes eine vergleichsweise hohe Flexibilität auf (Abbildung 2). Diese Ergebnisse sind auf die verschiedenen Längen der entsprechenden Linkerpeptide zurückzuführen und stehen im Einklang mit den beobachteten Ligationseffizienzen (Abbildung 1A). Bereits zuvor konnte gezeigt werden, dass ein flexibler Linker zur Analyse der schwachen Wechselwirkung zwischen der Tudor-Domäne und methyliertem Arginin notwendig ist.<sup>[17]</sup> Es kann geschlossen werden, dass die konformativen Einschränkungen des Protein-Protein-Komplexes nach

**Tabelle 1:** Ligationstrategien zur Erzeugung kovalenter Ypt1-GDI-Addukte.

	Ypt1-Thioester	Ypt1-BC	N-Cys-Ypt1
GDI-Thioester	–	n-Ypt1-GDI-n (C2C) Ausbeute 94 % $t_{1/2}$ = 5.6 min	n-GDI-n-Ypt1 (N2C) Ausbeute 54 % $t_{1/2}$ = 14.4 min
GDI-BC	n-Ypt1-GDI-n (C2C) Ausbeute 98 % $t_{1/2}$ = 4.8 min	–	–
N-Cys-GDI	n-Ypt1-n-GDI (N2C) Ausbeute 21 % $t_{1/2}$ = 23.8 min	–	–
N-Thioester-GDI	–	n.b.	Ypt1-n-n-GDI (N2N) k.R.

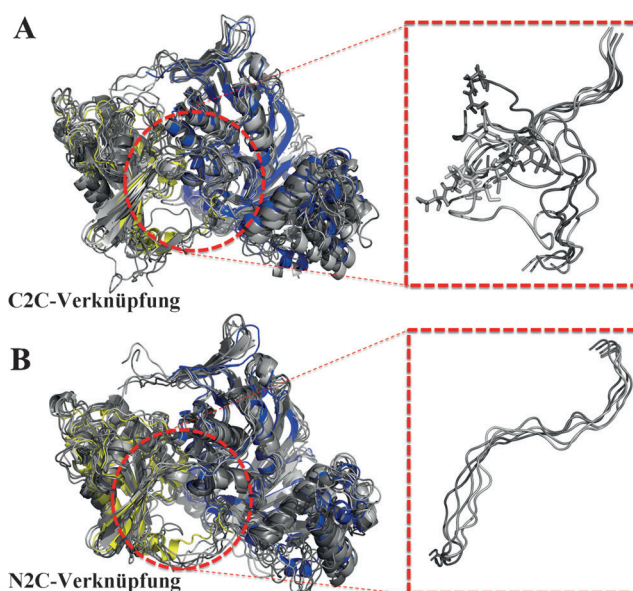
[a] Die Methoden sind in Klammern angegeben. „n“ kennzeichnet den N-Terminus der Proteine. n.b.: nicht bestimmt. k.R.: keine Reaktion beobachtet.



**Abbildung 1.** A) Zeitlicher Verlauf der N2C-, N2N- und C2C-Ligationen. Zur Berechnung der Reaktionshalbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) wurden die Auftragsungen der Reaktionsausbeuten gegen die Zeit gemäß einer einfachen exponentiellen Funktion angepasst. B) FRET-Messung des Nukleotid-austausches. Anregungswellenlänge: 298 nm, Emissionswellenlänge: 440 nm. Es wurden Konzentrationen von 1  $\mu$ M des Mant-GDP-gebundenen Ypt1-GDI Konstrukts oder 1  $\mu$ M des Mant-GDP-gebundenen Ypt1 in An- und Abwesenheit von 1.2  $\mu$ M GDI eingesetzt.

N2C-Ligation zur Beeinträchtigung der Bindung zwischen dem konservierten G4-Motiv (NKxD) und GDP in Ypt1 führen (Abbildung S12). MD-Simulationen der kovalent verknüpften und unligierten Konstrukte sowie der GDI-Apostruktur lieferten Aufschluss über die Auswirkungen der Ligation auf die Proteinkonformation. Insbesondere für  $\alpha$ -Helix D (Reste 129–137), die Teil der Prenylbindetasche ist, konnten nach kovalenter Verknüpfung der C-Termini weitreichende Konformationsänderungen beobachtet werden (Abbildung S13). Diese Reste nehmen gemäß der Sekundärstrukturklassifikation entsprechend dem Dictionary of Secondary Structures of Proteins (DSSP) in der Simulation der GDI-Apostruktur sowie des schwachen nichtkovalenten Komplexes zwischen Ypt1 und GDI eine stabile helikale Konformation ein, während sie nach C2C-Ligation zunehmend flexibler werden (Abbildung S13C). Diese Beobachtung legt eine Regulation der Lipidbindetasche durch die schwache PPI zwischen Ypt1 und GDI nahe.

Zum Nachweis der Reaktionsspezifität wurde das Ypt1-Homolog Rab1, das GDI aus Hefe nicht bindet, der C2C-Ligationsstrategie mit GDI unterzogen (Abbildung S14). Diese Reaktion lieferte keine Produkte. Da GDI GDP-, aber



**Abbildung 2.** Repräsentative Strukturen der MD-Simulationen von A) C2C- und B) N2C-ligierten Ypt1-GDI-Komplexen, die auf die Kristallstruktur des doppelt prenylierten Ypt1-GDI-Komplexes überlagert worden sind (PDB-Code: 2BCG). Die Frames der MD-Simulation wurden einer Clustering-Analyse unterzogen. Die resultierenden Strukturen sind grau dargestellt. Die Graustufen der Proteinstrukturen stellen den prozentualen Anteil der Strukturen des jeweiligen Clusters an der Gesamtsimulation dar, wobei der dunkelste Grauton die repräsentative Struktur des am stärksten vertretenen Clusters kennzeichnet (Tabelle S1). Ypt1 der Kristallstruktur wurde gelb eingefärbt, während GDI in blau dargestellt ist. Die Position des BC-Linkers ist durch Darstellung als Stabmodell hervorgehoben.

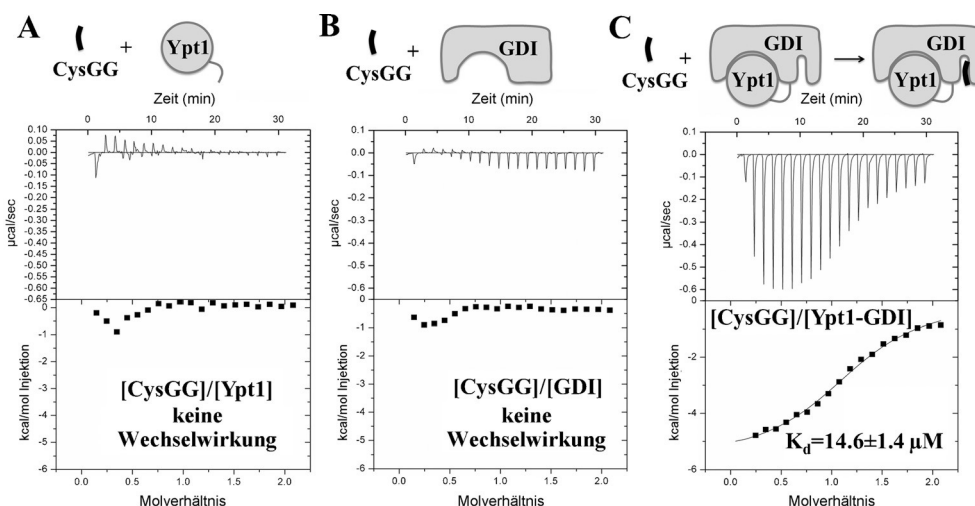
nicht GTP-gebundenes Rab bindet,<sup>[18]</sup> wurde außerdem die Nukleotidabhängigkeit der Reaktion untersucht. Ypt1 mit nicht hydrolysierbarem GTP-Analogon GppNHp oder GMP wurde in der C2C-Ligation angewendet. Im Vergleich zu Ligationen mit GDP-gebundenem Ypt1 erfolgten diese Reaktionen wesentlich langsamer, und sie ergaben geringere Ausbeuten (Abbildung S15). Diese Ergebnisse stützen die Grundannahme, dass die Reaktionseffizienz maßgeblich von der Ypt1-GDI-Wechselwirkung abhängt.

Im Komplex mit prenyliertem Rab inhibiert GDI die Freisetzung von gebundenen Nukleotiden,<sup>[19]</sup> sodass die Untersuchung dieser Funktion eine Charakterisierung des C2C-ligierten Ypt1-GDI-Komplexes ermöglicht. Der Nukleotid-austausch wurde anhand von FRET („fluorescence resonance energy transfer“) Assays mit Mant-GDP-gebundenem Ypt1 analysiert (Abbildung S16). Unter Zugabe eines Überschusses GTP wurde Ypt1-gebundenes Mant-GDP ausgetauscht, während für das kovalente Addukt zwischen Ypt1 und GDI der Nukleotidaustausch unterbunden wurde (Abbildungen 1 B, S17). Dies ist ein Hinweis auf das Vorhandensein der nativen Ypt1:GDI-Wechselwirkung, da GDI dieselbe Funktion erfüllt wie im Komplex mit prenyliertem Ypt1.<sup>[20]</sup>

Die Etablierung kovalenter Ypt1-GDI Komplexe ermöglicht nun die Untersuchung der Funktion von GDI im Rab-vermittelten Membranrecycling und des Mechanismus der Rekrutierung von prenyliertem Rab aus der Membran. Die Analyse bekannter Strukturen des Ypt1-GDI-Komplexes

suggeriert, dass eine Auswärtsbewegung der GDI- $\alpha$ -Helix D zur Bildung einer Lipidbindetasche führt, die in GDI-Apostrukturen nicht beobachtet wird.<sup>[13a,15]</sup> Dieses Öffnen der Lipidbindetasche wird entweder durch eine Wechselwirkung mit der Ypt1-GTPase-Domäne oder eine Anlagerung der carboxyterminalen Ypt1-Prenyleinheit vermittelt.<sup>[13a]</sup> Um zwischen beiden Szenarien unterscheiden zu können, wurde das C2C-ligierte Ypt1-GDI-Konstrukt als Analogon des transienten Komplexes verwendet. Die MD-

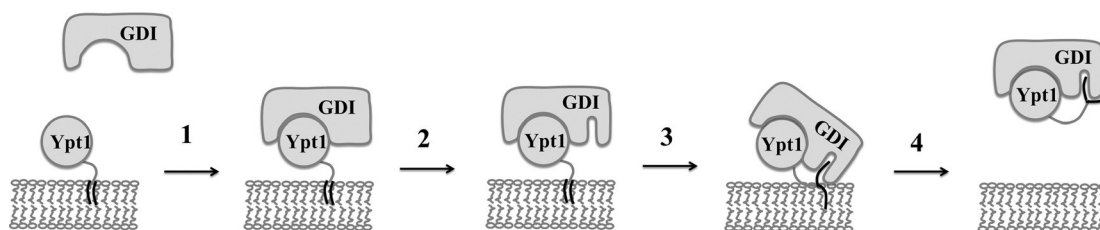
Simulationen suggerieren, dass die  $\alpha$ -helix D von GDI aufgrund der Ypt1-Bindung Konformationsänderungen eingeht. ITC-Messungen („isothermal titration calorimetry“) ermöglichen eine umfassende Analyse der Wechselwirkung der Prenylfunktion in Form des geranylgeranylierten Cystein (CysGG) mit den Proteinen des Komplexes (Abbildung 3). CysGG wechselwirkt ausschließlich mit dem Ypt1-GDI-Addukt ( $K_d = 14.6 \mu\text{M}$ ), nicht aber mit den Einzelproteinen und nur schwach mit einem  $50 \mu\text{M}$  Gemisch beider Proteine ( $K_d = 61 \mu\text{M}$ ; Abbildung S18). Es kann geschlossen werden, dass das Öffnen der GDI-Lipidbindetasche in enger Verbindung zur transienten Natur des Ypt1-GDI-Intermediats steht<sup>[21]</sup> und diese schwache PPI ausreicht, um Konformationsänderungen von GDI und ein damit einhergehendes Öffnen der Lipidbindetasche zu induzieren. Weiterhin konnte anhand der ITC-Daten auf ein äquimolares Verhältnis zwischen CysGG und Ypt1-GDI geschlossen werden, was darauf hinweist, dass die geöffnete Bindetasche genau eine Geranyleinheit stabil bindet. Dieses Ergebnis ist in Einklang mit der Kristallstruktur des stabilen Komplexes, in der die erste Prenyleinheit tief in der Bindetasche starke hydrophobe Wechselwirkungen eingeht, während die zweite Prenyleinheit oberflächenexponiert gebunden wird (Abbildung S19).<sup>[13a,15]</sup> Diese Beobachtungen lassen auf einen sequentiellen Bindemodus beider Geranyleinheiten schließen. Weiterhin suggerieren die Resultate einen möglichen Mechanismus des GDI-vermittelten Rab-Membranrecyclings. Ausgehend von einem geschlossenen Zustand der Lipidbindetasche, der die Stabi-



**Abbildung 3.** ITC-Messungen durch Titration von CysGG zum Ypt1-GDI Produkt der C2C-Ligation, zu Ypt1 oder zu GDI.

lität von GDI im Cytosol gewährleistet, führt die transiente Assoziation des membrangebundenen prenylierten Rab an GDI zu Konformationsänderungen und einem damit einhergehenden Öffnen der GDI-Lipidbindetasche. Diese hydrophobe Bindestelle ermöglicht die Bindung der ersten Prenyleinheit kompetitiv zur Membranbindung und eine nachfolgende Anlagerung der zweiten Prenyleinheit (Schema 2), sodass Rab von der Membran rekrutiert werden kann.

Der Erfolg der Ypt1-GDI-Untersuchungen veranlasste uns zur Durchführungen vergleichbarer Analysen mit dem KRas-Homodimer. Ras-GTPasen sind entscheidende Regulatoren einer Vielzahl von Signaltransduktionskaskaden vielfältiger zellulärer Prozesse, und Ras-Onkogene sind kennzeichnend für die meisten humanen Tumore.<sup>[22]</sup> Aktuelle Studien weisen auf die zentrale Rolle der Homodimerisierung in Ras-Signalprozessen hin.<sup>[23]</sup> Untersuchungen der Bedeutung des KRas-Homodimers werden durch die transiente Natur dieser PPI erschwert.<sup>[24]</sup> Um Zugang zum KRas-Homodimer zu erhalten, wurden KRas-Thioester, *N*-Cys-KRas, KRas-BC und *N*-Thioester-KRas synthetisiert (Abbildungen S20, S21). Die Ligation der Proteine in einem Reaktionsansatz führte innerhalb von drei Stunden zur Bildung des kovalent verknüpften Dimers (Abbildung S22). Weitergehende Experimente zeigten, dass mithilfe der C2C-Ligationsstrategie stabile KRas-Homodimere gebildet wurden, während für die N2C- und N2N-Ligationen keine Produktbildung beobachtet werden konnte (Abbildung S23). Im Einklang mit Studien, die belegen, dass das Vorhandensein



**Schema 2.** Arbeitshypothese für das GDI-vermittelte Rab-Membranrecycling. 1. Schwache Wechselwirkung, 2. Öffnen der Lipidbindetasche, 3. Bindung der ersten Prenyleinheit, 4. Bindung der zweiten Prenyleinheit.

der flexiblen carboxyterminalen hypervariablen Region von KRas eine Voraussetzung der Dimerisierung ist,<sup>[23a]</sup> konnten für derartig modifizierte Konstrukte keine Ligationsprodukte erhalten werden (Abbildung S24), sodass von einer räumlichen Nachbarschaft der C-Termini im Dimer ausgegangen werden kann.<sup>[25]</sup> Aufschlussreich war auch die Beobachtung, dass die Homodimerisierung abhängig von gebundenen Nukleotiden ist. Im Unterschied zu C2C-Ligationsansätzen mit GMP-gebundenen KRas-Formen konnten für die mit GDP- und GTP-gebundenen Formen Produkte detektiert werden (Abbildung S24). Nach Reinigung des kovalenten KRas-Homodimers mittels Größenausschlusschromatographie (Abbildung S25) steht nun erstmals das nichtlipidierte Dimer für weiterführende Analysen zur Verfügung.

Zusammenfassend wurde eine spezifische, einfach durchführbare Methode der kovalenten Verknüpfung von Wechselwirkungspartnern schwacher PPIs aufgrund der räumlichen Nachbarschaft beteiligter Reaktionspartner entwickelt. Der kovalente Ypt1-GDI Komplex ermöglicht eine Aufklärung des GDI-vermittelten Rab-Membranrecycling-mechanismus. Weiterhin bietet diese neuartige Ligationsstrategie Zugang zu einem stabilen KRas-Homodimer, das nun eine umfassende Untersuchung des Ras-Signalwegs ermöglicht. Die neu etablierten N2N- und C2C-Ligationsstrategien stellen eine Erweiterung der Möglichkeiten zur chemischen Modifikation von Proteinen dar. Die vorgestellten Ansätze zur kovalenten Verknüpfung transients Protein-Protein-Komplexe eröffnen neue Möglichkeiten zur Untersuchung von PPIs und damit verbundenen biologischen Prozessen.

## Danksagung

Y.W.W. dankt der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG; Fördernr.: SPP 1623, SFB 642) und dem Europäischen Forschungsrat (ERC; ChemBioAP) für die finanziellen Unterstützung. C.E. dankt dem Fonds der Chemischen Industrie für die Förderung durch ein Kekulé-Stipendium. O.K. dankt dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (Medizinische Chemie, TU Dortmund, Fördernr. BMBF 1316053) für die Unterstützung seiner Arbeit.

**Stichwörter:** C-terminales 1,2-Aminothiol · Native chemische Ligation · N-terminaler Thioester · Protein-Protein-Wechselwirkungen · Ras-Homodimer

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 8129–8133  
*Angew. Chem.* **2016**, 128, 8262–8266

- [1] a) A. Vinayagam, U. Stelzl, R. Foulle, S. Plassmann, M. Zenkner, J. Timm, H. E. Assmus, M. A. Andrade-Navarro, E. E. Wanker, *Sci. Signaling* **2011**, 4, rs8; b) U. Stelzl, U. Worm, M. Lalowski, C. Haenig, F. H. Brembeck, H. Goehler, M. Stroedicke, M. Zenkner, A. Schoenherr, S. Koeppen, J. Timm, S. Mintzlauff, C. Abraham, N. Bock, S. Kietzmann, A. Goedde, E. Toksoz, A. Droege, S. Krobitsch, B. Korn, W. Birchmeier, H. Lehrach, E. E. Wanker, *Cell* **2005**, 122, 957–968.
- [2] M. E. Cusick, N. Klitgord, M. Vidal, D. E. Hill, *Hum. Mol. Genet.* **2005**, 14, R171–R181.
- [3] S. E. Acuner Ozbabacan, H. B. Engin, A. Gursoy, O. Keskin, *Protein Eng. Des. Sel.* **2011**, 24, 635–648.
- [4] a) J. Rudolph, *Nat. Rev. Cancer* **2007**, 7, 202–211; b) J. R. Perkins, I. Diboun, B. H. Dessailly, J. G. Lees, C. Orengo, *Structure* **2010**, 18, 1233–1243.
- [5] M. Pelay-Gimeno, A. Glas, O. Koch, T. N. Grossmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 8896–8927; *Angew. Chem.* **2015**, 127, 9022–9054.
- [6] a) D. F. Hansen, M. A. Hass, H. M. Christensen, J. Ulstrup, J. J. Led, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 6858–6859; b) O. Vinogradova, J. Qin, *Top. Curr. Chem.* **2012**, 326, 35–45.
- [7] K. Melcher, *Curr. Protein Pept. Sci.* **2004**, 5, 287–296.
- [8] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 2nd ed., Elsevier, Amsterdam, **2012**, S. 215–342.
- [9] M. A. Trakselis, S. C. Alley, F. T. Ishmael, *Bioconjugate Chem.* **2005**, 16, 741–750.
- [10] V. P. Reddy Chichili, V. Kumar, J. Sivaraman, *Protein Sci.* **2013**, 22, 153–167.
- [11] a) P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science* **1994**, 266, 776–779; b) T. W. Muir, D. Sondhi, P. A. Cole, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 6705–6710.
- [12] H. Stenmark, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, 10, 513–525.
- [13] a) O. Pylypenko, A. Rak, T. Durek, S. Kushnir, B. E. Dursina, N. H. Thomae, A. T. Constantinescu, L. Brunsfeld, A. Watzke, H. Waldmann, R. S. Goody, K. Alexandrov, *EMBO J.* **2006**, 25, 13–23; b) Y. W. Wu, K. T. Tan, H. Waldmann, R. S. Goody, K. Alexandrov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 12294–12299.
- [14] L. Yi, H. Sun, A. Itzen, G. Triola, H. Waldmann, R. S. Goody, Y. W. Wu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 8287–8290; *Angew. Chem.* **2011**, 123, 8437–8440.
- [15] A. Rak, O. Pylypenko, T. Durek, A. Watzke, S. Kushnir, L. Brunsfeld, H. Waldmann, R. S. Goody, K. Alexandrov, *Science* **2003**, 302, 646–650.
- [16] Y. W. Wu, R. S. Goody, R. Abagyan, K. Alexandrov, *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 13185–13192.
- [17] K. Tripsianes, N. K. Chu, A. Friberg, M. Sattler, C. F. Becker, *ACS Chem. Biol.* **2014**, 9, 347–352.
- [18] Y. W. Wu, L. K. Oesterlin, K. T. Tan, H. Waldmann, K. Alexandrov, R. S. Goody, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, 6, 534–540.
- [19] a) T. Sasaki, A. Kikuchi, S. Araki, Y. Hata, M. Isomura, S. Kuroda, Y. Takai, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 2333–2337; b) J. C. Sanford, J. M. Yu, J. Y. Pan, M. Wesslingresnick, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 26904–26909.
- [20] a) O. Ullrich, H. Stenmark, K. Alexandrov, L. A. Huber, K. Kaibuchi, T. Sasaki, Y. Takai, M. Zerial, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 18143–18150; b) T. Soldati, M. A. Riederer, S. R. Pfeffer, *Mol. Biol. Cell* **1993**, 4, 425–434.
- [21] A. Ignatev, S. Kravchenko, A. Rak, R. S. Goody, O. Pylypenko, *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 18377–18384.
- [22] Y. Pylyayeva-Gupta, E. Grabocka, D. Bar-Sagi, *Nat. Rev. Cancer* **2011**, 11, 761–774.
- [23] a) X. Nan, T. M. Tamguney, E. A. Collisson, L. J. Lin, C. Pitt, J. Galeas, S. Lewis, J. W. Gray, F. McCormick, S. Chu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, 112, 7996–8001; b) W. C. Lin, L. Iversen, H. L. Tu, C. Rhodes, S. M. Christensen, J. S. Iwig, S. D. Hansen, W. Y. Huang, J. T. Groves, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, 111, 2996–3001.
- [24] A. Dementiev, *Protein Expression Purif.* **2012**, 84, 86–93.
- [25] S. Muratcioglu, T. S. Chavan, B. C. Freed, H. Jang, L. Khavrutskii, R. N. Freed, M. A. Dyba, K. Stefanisko, S. G. Tarasov, A. Gursoy, O. Keskin, N. I. Tarasova, V. Gaponenko, R. Nussinov, *Structure* **2015**, 23, 1325–1335.

Eingegangen am 5. Februar 2016  
Online veröffentlicht am 23. Mai 2016