

## Abstract

Protein prenylation comprising farnesylation and geranylgeranylation catalyzed by FTase and GGTase I, respectively, facilitates the association of proteins to biological membranes like the plasma membrane, which is usually critical for their activity. A multitude of important proteins involved in key cellular processes require such a prenylation modification. Indeed, Ras proteins, which are farnesylated by FTase, are central nodes in various signaling pathways that regulate crucial cellular functions like cell differentiation, proliferation, migration, and apoptosis. Consequently, mutations in their genes often lead to severe diseases, such as cancer. With this knowledge, our group recently designed so-called cell-permeable CaaX-peptides consisting of the cell-penetrating peptide sC18\* and C-terminal parts of Ras proteins, which are crucial for the farnesylation process and include a secondary signal and a CaaX motif. The initial idea of these peptides was to investigate and interfere with the prenylation process of proteins such as Ras. Recent studies indicated high cellular uptake and cytotoxicity of the CaaX-peptides, particularly in cancer cells. Moreover, these peptides interacted specifically with prenyltransferases and there is first evidence for altered Ras signaling by the CaaX-peptides.

Based on the previously obtained findings, the underlying mechanisms for the high cellular uptake of the CaaX-peptides and their impact on the prenylation machinery and various signaling cascades related to farnesylation should be investigated within this thesis. Several control experiments to investigate the influence of cysteine-mediated cellular uptake revealed a clear dependence on the CaaX motif for the observed high translocation. Moreover, the CaaX-1 peptide interacted specifically with recombinantly expressed FTase, and depending on a functional CaaX motif, this interaction resulted in farnesylation of CaaX-1. Furthermore, investigating the influence of the CaaX-peptides on a KRas mutant and a wildtype cell line indicated increased cytotoxicity in the KRas mutant cell line, and that this cytotoxicity is not caused by disturbing the membrane integrity but more related to intracellular mechanisms. Colocalization studies in these two cell lines also revealed localization of CaaX-1 with lipid droplets and the ER and that this colocalization is more present in KRas mutant cells. Finally, it has been shown that CaaX-1 altered Ras protein expression levels and Ras signaling depending on the KRas genotype.

## Zusammenfassung

Die Prenylierung von Proteinen, bestehend aus Farnesylierung und Geranylgeranylierung, die von FTase beziehungsweise GGTase I katalysiert wird, ermöglicht die Verankerung von Proteinen mit biologischen Membranen wie der Plasmamembran, was in der Regel entscheidend für ihre Aktivität ist. Eine Vielzahl wichtiger Proteine, die an grundlegenden zellulären Prozessen beteiligt sind, benötigen eine solche Prenylierungsmodifikation. Tatsächlich sind Ras-Proteine, die von FTase farnesyliert werden, zentrale Knotenpunkte in verschiedenen Signalwegen, die entscheidende Zellfunktionen wie Zelldifferenzierung, Proliferation, Migration und Apoptose regulieren. Folglich führen Mutationen in ihren Genen häufig zu schweren Krankheiten, wie beispielsweise Krebs. Mit diesem Wissen hat unsere Gruppe kürzlich so genannte zellpermeable CaaX-Peptide entwickelt, die aus dem zellpenetrierenden Peptid sC18\* und C-terminalen Abschnitten von Ras-Proteinen bestehen, die für den Farnesylierungsprozess wichtig sind und sowohl ein sekundäres Signal als auch ein CaaX-Motiv enthalten. Die ursprüngliche Idee dieser Peptide war es, den Prenylierungsprozess von Proteinen wie Ras zu untersuchen und zu stören. Jüngste Studien zeigten eine hohe zelluläre Aufnahme und Zytotoxizität der CaaX-Peptide, insbesondere in Krebszellen. Außerdem interagierten diese Peptide spezifisch mit Prenyltransferasen, und es gibt erste Hinweise auf veränderte Aktivierungen von Ras-Signalwegen durch die CaaX-Peptide.

Auf der Grundlage der bisher gewonnenen Erkenntnisse sollten im Rahmen dieser Arbeit die zugrundeliegenden Mechanismen für die hohe zelluläre Aufnahme der CaaX-Peptide und ihre Auswirkungen auf die Prenylierungsmaschinerie und verschiedene Signalkaskaden im Zusammenhang mit der Farnesylierung untersucht werden. Mehrere Kontrollexperimente zur Untersuchung des Einflusses der Cystein-vermittelten zellulären Aufnahme zeigten eine klare Abhängigkeit vom CaaX-Motiv für die beobachtete hohe Translokation. Darüber hinaus interagierte das CaaX-1-Peptid spezifisch mit rekombinant exprimierter FTase, und abhängig von einem funktionellen CaaX-Motiv führte diese Interaktion zur Farnesylierung von CaaX-1. Die Untersuchung des Einflusses der CaaX-Peptide auf eine KRas-Mutante und eine Wildtyp-Zelllinie deutete außerdem auf eine erhöhte Zytotoxizität in der KRas-Mutanten-Zelllinie hin, und dass diese Zytotoxizität nicht durch eine Störung der Membranintegrität verursacht wurde, sondern eher auf intrazelluläre Mechanismen zurückzuführen ist. Kollokalisierungsstudien in diesen beiden Zelllinien ergaben auch eine Kollokalisierung von CaaX-1 mit Lipidtröpfchen und dem ER, und dass diese Kollokalisierung in den KRas-Mutantenzellen stärker ausgeprägt ist. Schließlich wurde gezeigt, dass CaaX-1 die Expression des KRas-Proteins und die Ras Signalwege in Abhängigkeit vom KRas-Genotyp verändert.