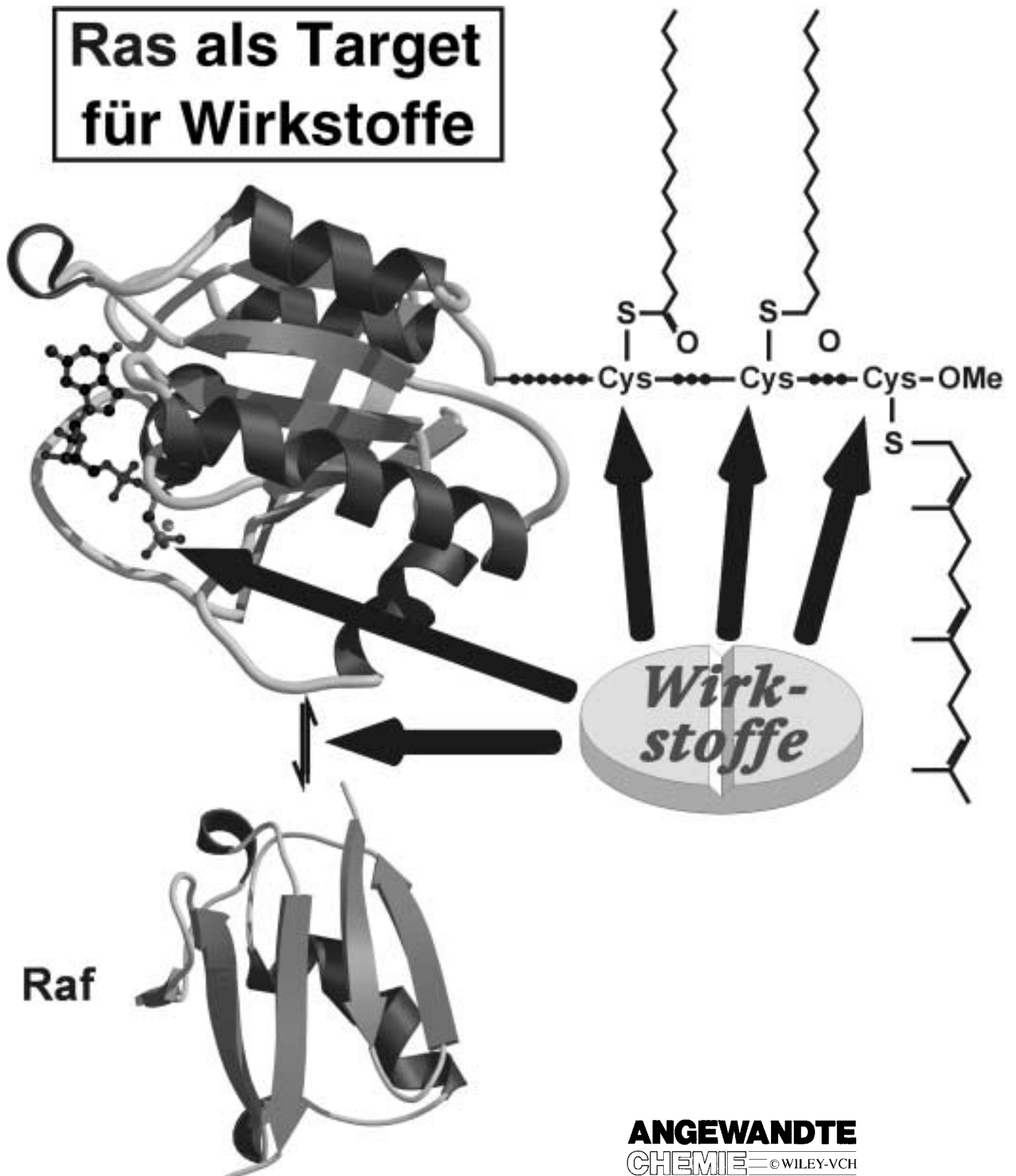


Ras als Target für Wirkstoffe



Ras – ein molekularer Schalter bei der Tumorentstehung

Alfred Wittinghofer* und Herbert Waldmann

Das GTP-hydrolysierende Protein Ras ist das Produkt eines Proto-Onkogens, das in 20–30 % aller menschlichen Tumoren mutiert vorkommt. Es bindet GDP/GTP mit hoher Affinität und weist in Gegenwart von GTPase-aktivierenden Proteinen (GAP) eine hohe GTP-Hydrolyse-Aktivität auf. Das proto-onkogene „normale“ Ras fungiert als regulierter molekularer Schalter in Signaltransduktionswegen, die Zellwachstum, Zelldifferenzierung,

Apoptose und weitere zelluläre Ereignisse beeinflussen. Ras wechselt dabei zwischen zwei Zuständen, in denen es entweder GTP gebunden hat (Schalterstellung „ein“) oder das GTP zu GDP hydrolysiert ist (Schalterstellung „aus“). Die onkogenen Varianten von Ras enthalten Punktmutationen, die die GTPase-Aktivität in Gegenwart und Abwesenheit von GAP blockieren. Dies wiederum behindert den Übergang von der GTP- zur GDP-

Form, führt zu einer Akkumulation von aktivem Ras und trägt damit zur Tumorentstehung bei. Um die molekularen Grundlagen der Schalterfunktion von Ras-Proteinen zu verstehen und gegen Ras gerichtete Antitumorstoffe zu entwickeln, wurden große Anstrengungen unternommen.

Stichwörter: Cytostatika • Enzyminhibitoren • GTP-Hydrolyse • Proteine • Wirkstoff-Forschung

1. Einleitung

Das Protein Ras ist namensgebend für eine Superfamilie von Proteinen, den so genannten Ras-ähnlichen GTP-bindenden Proteinen. Ihre gemeinsamen Eigenschaften sind ein Molekulargewicht von 20–25 kDa und die Fähigkeit, Guaninnucleotide zu binden. Sie fungieren als molekulare Schalter, indem sie zwischen einer GTP-gebundenen aktiven und einer GDP-gebundenen inaktiven Konformation wechseln. Sie regulieren eine Vielzahl von zellulären Reaktionen, können aber dennoch in zwei Hauptkategorien unterteilt werden: zum einen die Signalproteine, die katalytisch wirken und eine wichtige Rolle bei der Kommunikation zwischen Zellen und Zellkompartimenten spielen, und zum anderen die stöchiometrisch wirksamen Transportfaktoren, die den Materialfluss zwischen Zellkompartimenten regulieren.

In diesem Übersichtsartikel werden wir uns auf das Signalprotein Ras konzentrieren, das einer der Hauptschalter vieler Signaltransduktionsprozesse ist, welche z. B. Wachstum, Differenzierung, Zellzyklus und Apoptose regulieren, die einander zum Teil entgegengesetzte Prozesse darstellen. Auch wenn wir die biologische Funktion von Ras umreißen werden, so konzentrieren wir uns in diesem Artikel auf strukturbiochemische und biophysikalische Aspekte des Proteins und der

Anwendung dieses Wissens bei der Entwicklung potentieller Antitumorstoffe.

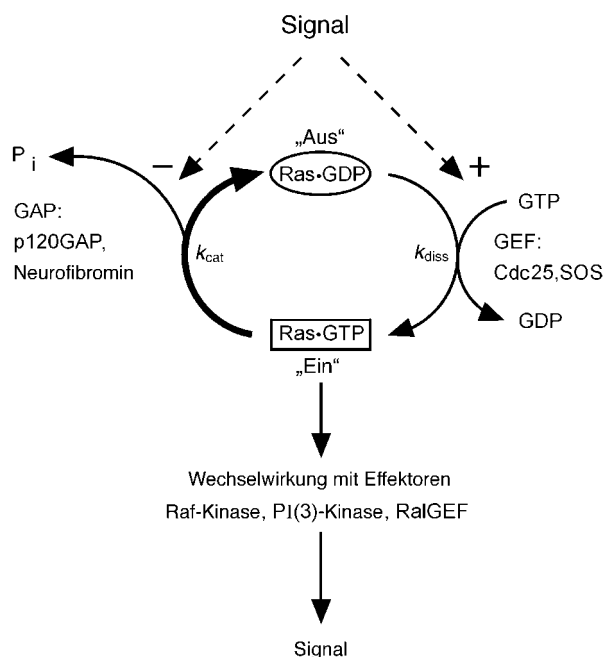
Für detailliertere Informationen über die Biologie von Ras und ältere Literaturangaben sollten andere Übersichtsartikel zu Rate gezogen werden.^[1–5]

2. Ras als molekularer Schalter

2.1. Biologische Signaltransduktion

Es gibt drei humane Ras-Gene, *H-*, *N-* und *K-Ras*. Letzteres wird in zwei alternative Varianten gespleißt, *K-Ras4A* und *K-Ras4B*, die sich allein in den letzten, im vierten Exon kodierten, 25 Aminosäuren unterscheiden. Die entsprechenden H-, N- und K-Ras-Proteine haben Molekulargewichte von 21 kDa. Sie werden posttranslational durch Anhängen lipophiler Gruppen an den C-Terminus modifiziert. Diese Modifikation ist für die biologische Funktion des Proteins unabdingbar.^[6] Ras ist ein molekularer Schalter, der zwischen der GTP- und der GDP-gebundenen Stellung hin- und herwechselt (Schema 1). Da die intrinsischen „Ein“- und „Aus“-Reaktionen sehr langsam sind, bedürfen sie der regulatorischen Unterstützung durch Guaninnucleotid-Austauschfaktoren (GEF = Guanine nucleotide Exchange Factor) und GTPase-aktivierenden Proteinen (GAP), die die Lebensdauer beider Zustände bestimmen. In Ruhestellung ist Ras an GDP gebunden. Aktiviert wird es durch den GEF, der die Dissoziation von GDP katalysiert und dadurch die

[*] Prof. Dr. A. Wittinghofer, Prof. Dr. H. Waldmann
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)
Fax: (+49) 231-1332199
E-mail: Alfred.Wittinghofer@mpi-dortmund.mpg.de



Schema 1. Der Ras-Cyclus. In der GDP-gebundenen Form ist Ras inaktiv. Es kann durch die Wirkung von Guaninnucleotid-Austauschfaktoren (GEFs) aktiviert werden. In der GTP-gebundenen Form wechselwirkt es mit Effektoren, Proteinen, die über ihre Fähigkeit definiert sind, die GTP-Form zu erkennen. Um den Cyclus zu schließen, hydrolysiert Ras GTP zu GDP und anorganischem Phosphat (P_i). Im Prinzip kann Ras auch aktiviert werden, indem die GTPase-Reaktion inhibiert wird.

Beladung mit GTP, der in der lebenden Zelle vorherrschenden Guaninnucleotidform, erleichtert. Im GTP-gebundenen Zustand wechselwirkt Ras mit Effektoren. Als solche definiert man Moleküle, die spezifisch mit der GTP-Form wechselwirken und ein Signal weiterleiten. Die Signalweiterleitung wird durch die an sich langsame, durch Ras-spezifische GAPs aber beschleunigte GTPase-Aktivität von Ras gestoppt. Im GDP-gebundenen Zustand kann Ras nicht mehr mit Effektoren wechselwirken.

Die Lebensdauer eines von Ras weitergeleiteten Signals wird durch die Lebenszeit der aktiven Form bestimmt. Wird diese künstlich verlängert, so kann die nun unregulierte biologische Antwort zu dramatischen Konsequenzen in der Zelle führen. Ras wurde als das zentrale Gen in Tumoviren von Nagern entdeckt (der Name Ras leitet sich von *Rat sarcoma* ab) und daher als Onkogen deklariert, d.h. als Gen, das in der Lage ist, Tumore in Tieren oder Zellkulturen zu induzieren.^[2, 5] Später wurden aktivierte Formen von Ras auch in menschlichen Tumoren gefunden. Es wird heute angenommen, dass bis zu 30% aller menschlichen Tumore über ein mutiertes *Ras*-Onkogen verfügen, zumeist *N*- oder *K*-*Ras*. Verantwortlich für die Aktivierung des *Ras*-Proto-Onkogens zum Onkogen sind Punktmutationen in den Positionen 12, 13 oder 61, deren biochemische Folge der Verlust der GTPase-Aktivität ist.^[2, 5] Da auch weitere Gene des Ras-Signaltransduktionswegs in menschlichen und Tier-tumoren als Onkogene fungieren, sind Ras und seine Signal-

Alfred Wittinghofer, geboren 1943 in Xanten am Niederrhein, studierte in Aachen Chemie und fertigte seine Diplom- und seine Doktorarbeit im Labor von Prof. Dr. H. Zahn am Deutschen Wollforschungsinstitut in Aachen an, wo er die A-Kette von Insulin mit einer vorgeformten selektiven intramolekularen Disulfidbrücke in Gegenwart zweier zusätzlicher Cysteinreste synthetisierte. An der Universität von North Carolina verbrachte er drei Jahre als Postdoc, wo er mit Dr. R. Hiskey an der Präparation von semisynthetischem Insulin arbeitete. Danach beschäftigte er sich mehrere Jahre als Postdoc am Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung in Heidelberg mit der Untersuchung von Phosphoryl-Transferasen. Nachdem er dort seine eigene Arbeitsgruppe etabliert hatte, wandte er sich Ras und Ras-ähnlichen GTP-bindenden Proteinen zu, die seitdem den Schwerpunkt seiner Arbeiten bilden. 1992 wurde er zum Direktor des Max-Planck-Instituts für molekulare Physiologie ernannt.



A. Wittinghofer

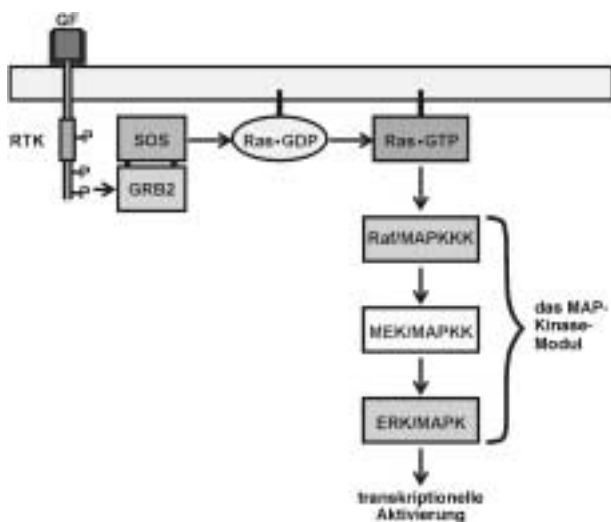


H. Waldmann

Herbert Waldmann, geboren 1957, promovierte 1985 an der Universität Mainz bei Prof. Horst Kunz. Nach einem Postdoc-Aufenthalt (1985–1986, Harvard University, George Whitesides) und der Habilitation (1991, Universität Mainz) nahm er 1991 einen Ruf auf eine Professur an der Universität Bonn an. 1993 wechselte er an die Universität Karlsruhe als Professor für Organische Chemie. 1999 wurde er Direktor am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund (Abteilung für Chemische Biologie) und Professor für Biochemie an der Universität Dortmund. Er erhielt den Friedrich-Weygand-Preis, den Carl-Duisberg-Preis der Gesellschaft Deutscher Chemiker und den Steinhof-Preis. Seine Forschungsinteressen sind derzeit die Bioorganische Chemie und die Naturstoffsynthese sowie die Biokatalyse, die stereoselektive Synthese und die kombinatorische Chemie. Ein Schwerpunkt seiner Arbeiten ist hierbei die Kombination von Organischer Chemie, Biophysik und Biologie in Hinblick auf die Synthese und biologische Bewertung von Peptid- und Proteinkonjugaten, die an biologischen Signaltransduktionsprozessen beteiligt sind. Seit kurzem beschäftigt er sich auch mit der Festphasensynthese von Naturstoffen und von Verbindungsbibliotheken, die sich von Naturstoffen ableiten (weitere Informationen: www.chemie.uni-karlsruhe.de/OC/akwa/ak.htm).

transduktionswege wichtige Ziele für die Antitumorthherapie. In der Tat sind bereits große Fortschritte in diese Richtung gemacht worden.

In den frühen neunziger Jahren konnte durch Studien an Säugetier-Zelllinien sowie durch genetische Untersuchungen an *Drosophila melanogaster*^[7] und *Caenorhabditis elegans*^[8] ein linearer Signaltransduktionsweg etabliert werden, der Ras mit Rezeptoren für Wachstumsfaktoren und der MAP-Kinase verbindet. Dieser „Ras-Weg“ wird heute als Paradigma für biologische Signaltransduktion betrachtet.^[4, 9] Die Weiterleitung eines Signals beginnt mit der Bindung eines Wachstumsfaktors, wie dem EGF (*Epidermal Growth Factor*) oder dem PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*), an die extrazelluläre Domäne ihrer entsprechenden Rezeptoren (Schema 2).



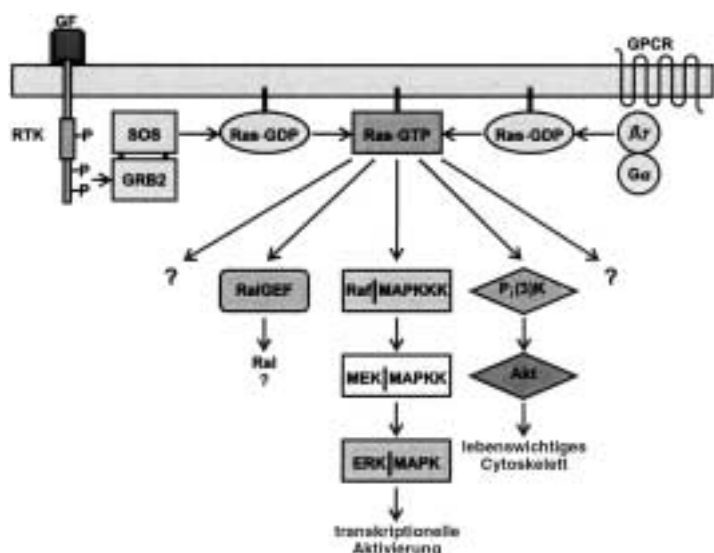
Schema 2. Eine einfache Version des Ras-Signaltransduktionsweges, wie er im Text beschrieben wird. Die Rekrutierung des RasGEF SOS an die Plasmamembran durch RTKs (Rezeptor-Tyrosin-Kinasen), die durch die Bindung eines Wachstumsfaktors aktiviert wurden, führt zur Aktivierung von Ras. Ras wiederum aktiviert eine Kaskade von Protein-Kinasen: MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK), MAP-Kinase-Kinase (MAPKK), MAP-Kinase (MAPK). Dabei aktiviert jeweils die Kinase oberhalb (upstream) die nächste in der Reihe, indem sie sie phosphoryliert. Phosphorylierte MAPK (= ERK) wird in den Zellkern transportiert, um dort Transkriptionsfaktoren zu phosphorylieren, die die zelluläre Antwort auf das ursprüngliche Signal, den Wachstumsfaktor (GF = Growth Factor), vermitteln.

Bei den Rezeptoren handelt es sich um Transmembranproteine mit einer cytoplasmatischen Tyrosin-spezifischen Protein-Kinase-Domäne (RTK = Rezeptor Tyrosine Kinase). Die Bindung eines Liganden führt zur Dimerisierung des Rezeptors. Daraufhin findet im cytoplasmatischen Teil der Rezeptoren sowohl in der Kinasedomäne als auch in anderen Regionen eine Transphosphorylierung von Tyrosinseitenketten statt. Die Phosphorylierung aktiviert den Rezeptor und schafft Bindungsstellen für Proteine mit SH2-Domänen (*Src Homology 2*): Dies sind Proteinmodule, die phosphorylierte Tyrosinseitenketten in sequenzspezifischen Kontexten erkennen (*src* ist ein Onkogen, das aus einem Sarkom, engl. *sarcom*, isoliert wurde). Eines dieser Proteine ist Grb2 (*Growth factor receptor binding*), das mit dem Ras-Guaninnucleotid-Austauschfaktor (RasGEF) SOS (nach dem *Drosophila*-Gen *son-of-sevenless*) im Komplex vorliegt. Man geht davon aus, dass

Ras durch die Translokation von SOS zur Plasmamembran aktiviert wird, indem beide Proteine in enge Nachbarschaft gebracht werden, wodurch eine Wechselwirkung begünstigt wird.

Aktiviertes Ras wechselwirkt mit einem nachgelagerten (downstream) Effektor, der Ser/Thr-spezifischen Protein-Kinase Raf, die selbst als ein Onkogen identifiziert wurde (*Rapid fibrosarcoma*). Die Begriffe „upstream“ und „downstream“ leiten sich in der Terminologie der Signaltransduktion von einem (mittlerweile veralteten) Konzept einer linearen hierarchischen Ordnung von Reaktionen ab, bei dem eine Reaktion zum fraglichen Protein führt (upstream) und eine von ihm weg (downstream). Die Translokation der Raf-Kinase zur Plasmamembran aktiviert die Kinaseaktivität auf noch unvollständig verstandene Weise. Die Aktivierung erfolgt sowohl über allosterische Regulation als auch durch die Beteiligung weiterer Kinasen und regulatorischer Proteine wie z. B. 14-3-3.^[1, 10–12] Ist Raf einmal aktiviert, aktiviert es seinerseits durch Phosphorylierung die Protein-Kinase MEK, die dann die Protein-Kinase ERK aktiviert. Diese drei in Reihe geschalteten Kinasen werden auch MAP-Kinase (für Mitogen Activated Protein Kinase), MAP-Kinase-Kinase bzw. MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPK, MAPKK bzw. MAPKKK) genannt. Sie konstituieren das so genannte MAP-Kinase-Modul.^[13] Derartige Kinase-Module finden sich in großer Vielfalt in allen höheren eukaryotischen Zellen und sind manchmal (evtl. immer) an so genannte Gerüstproteine gebunden, die dabei helfen, das Modul zu organisieren und möglicherweise auch die Spezifität der Signalweiterleitung zu gewährleisten.^[14] Die Weiterleitung des Ras-Signals wird durch den Eingriff von GAP gestoppt, das eventuell ebenfalls an die Plasmamembran gebracht wird, um eine effizientere Wechselwirkung zu ermöglichen. In der Tat weist der GAP-Prototyp p120GAP eine SH2-Domäne auf und es konnte gezeigt werden, dass p120GAP mit aktivierten Rezeptoren wechselwirkt.^[15–19] Das Signal kann auch gestoppt werden, indem MAPK SOS phosphoryliert, das dann nicht mehr mit Grb2 wechselwirken kann.^[20–23]

Die Aufklärung der linearen Signaltransduktionskaskade über das MAP-Kinase-Modul war ein wegweisender Erfolg, an dem viele Arbeitsgruppen beteiligt waren. Man nahm an, die biologische Funktion von Ras damit verstanden zu haben. Jedoch wurde es in den letzten Jahren zunehmend klarer, dass die verschiedenen Funktionen von Ras wahrscheinlich nicht mit einer einzigen linearen MAP-Kinase-Kaskade erklärt werden können und dass sehr wahrscheinlich verschiedene Signale, die Ras vor- und nachgeschaltet sind, herangezogen werden müssen, um die Komplexität der Biologie von Ras verstehen zu können (Schema 3). Es wurde gezeigt, dass Ras nicht allein von Rezeptortyrosin-Kinasen (RPTKs), sondern z. B. auch von cytoplasmatischen Tyrosin-Kinasen wie *Src* und von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) aktiviert werden kann und dass es unterschiedliche Signale vermutlich durch die Wechselwirkung mit verschiedenen Effektoren induziert. In einem herausragenden Experiment konnte von White et al.^[24] gezeigt werden, dass es durch die Einführung von Mutationen in die Effektorregion von Ras möglich ist, verschiedene Downstream-Signalwege von Ras voneinander zu unterscheiden und gezielt bestimmte Wege zu blockieren,



Schema 3. Die Beteiligung von Ras an verschiedenen Signaltransduktionsereignissen. Ras wird von mehr als einem Upstream-Signal aktiviert und gibt dieses Signal an mehr als einen Effektor weiter. Das Ergebnis der zellulären Antwort hängt von der Zahl der Signale und deren Weitergabe durch das (die) Zielprotein(e) (Transkriptionsfaktoren) ab.

ohne andere zu beeinträchtigen.^[24–28] Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass mehr als ein Signalweg angeschaltet sein muss, um die vollständige Transformation einer Zelle durch Ras zu erreichen.

Zwischenzeitlich wurde mit der neu entwickelten Technik der Two-Hybrid-Analyse eine große Zahl von potentiellen Molekülen identifiziert, die mit der GTP-Form – aber nicht mit der GDP-Form – von Ras wechselwirken und somit potentielle Effektoren sind. Die wichtigsten unter diesen sind die verschiedenen Isoformen der Lipid-Kinase Phosphatidylinositol-3'-Kinase (PI3K)^[29–31] und die von RalGEF,^[32–34] einem GEF für das Ras-verwandte Protein Ral, von dem diverse Isoformen (Rgl, Rlf/RalGEF2^[35, 36]) beschrieben wurden. Eine weitere Komplikation beim Entwirren des komplizierten Netzes von Wechselwirkungen stellt die Tatsache dar, dass Ras-ähnliche Proteine wie Rap (vier Isoformen) und R-Ras (drei Isoformen) mit dem gleichen Satz an Effektoren auf GTP-abhängige Weise wechselwirken.

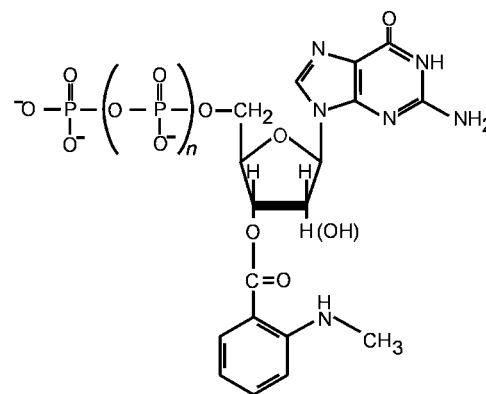
Auch wenn es verlockend ist zu spekulieren, dass von einem speziellen Signalweg ein spezifischer biologischer Effekt angeschaltet wird, so ist dies doch nicht der Fall. Vielmehr dürfen wir annehmen, dass Ras immer mehrere Signalwege gleichzeitig induziert. Damit hängt die abschließende Signalwirkung von einer Vielzahl Ras-abhängiger und Ras-unabhängiger paralleler und miteinander verknüpfter (crossover) Signalwege ab, die sich von Zelltyp zu Zelltyp unterscheiden. Diese Signale werden letztlich von einer komplexen Maschinerie, die Ras nachgeschaltet ist (downstream), zu einer Zelltyp-spezifischen biologischen Antwort umgesetzt.

2.2. Biochemie und Struktur von Ras

Die meisten biochemischen und strukturellen Untersuchungen wurden ohne ersichtlichen Grund mit H-Ras (kurz:

Ras) durchgeführt, dessen Eigenschaften im Folgenden diskutiert werden. Dabei sollte jedoch klar sein, dass die biochemischen und strukturellen Daten der anderen Isoformen ähnlich sind, auch wenn ihre Sequenzen nicht vollständig übereinstimmen. Ras besteht aus 189 Aminosäuren mit fünf konservierten Sequenzelementen, die auch in anderen Ras-ähnlichen Proteinen gefunden werden. Ihre Aufgabe ist die Bindung von Guaninnucleotiden und die Hydrolyse von GTP. Die letzten vier Aminosäuren (CVLS) bilden die so genannte CAAX-Box; hierbei steht C für Cystein, A für eine aliphatische und X für jede beliebige Aminosäure. CAAX ist die Erkennungssequenz für das Enzym Farnesyl-Transferase, welche das Cystein mit einem C15-Prenylrest thioalkyliert (siehe Abschnitt 3). Dies ist die erste in einer Reihe von posttranslationalen Modifikationen, die für die Verankerung von Ras in der Plasmamembran verantwortlich sind. Dies ist wiederum für die biologische Funktion von Ras unabdingbar.^[37–40] Es konnte gezeigt werden, dass die ersten 166 Aminosäuren von Ras für seine biochemischen Eigenschaften notwendig und hinreichend sind^[41] und dass der C-Terminus allein für die Lokalisierung an der Plasmamembran notwendig ist und mit anderen Proteinen nicht direkt wechselwirkt. Dementsprechend wurden aus technischen Gründen viele biochemische und strukturelle Untersuchungen an Ras mit C-terminal verkürzten Varianten (Aminosäurereste 1–166 oder 1–172) des Proteins durchgeführt.

Ras bindet Guaninnucleotide mit hoher Spezifität und Affinität. Die Affinität für GDP/GTP ist so hoch, dass zu ihrer Messung keine Gleichgewichtsmethode benutzt werden kann. Daher wird die Affinität durch Messung der Assoziations- und der Dissoziationsgeschwindigkeit bestimmt. Am einfachsten geschieht dies mit fluoreszierenden Methylantraniloyl- (kurz: mant- oder m-) Nucleotiden (Schema 4).



Schema 4. Beispiele für fluoreszierende Guanosinnucleotide, die bei der biochemischen Analyse von Ras-Proteinen verwendet werden. Sie tragen eine fluoreszierende N-Methylantraniloylgruppe an der 2'- oder 3'-Position der Ribose. Abgebildet sind das 2'-Deoxy-mGDP- ($n=1$) und das 2'-dmGTP-Nucleotid ($n=2$). Im Falle der Ribose-Derivate wird im Allgemeinen ein Gemisch aus den 2'- und 3'-Analoga verwendet.

Diese haben sich bei der Untersuchung der Biochemie des Ras-Proteins als sehr vielseitig erwiesen.^[42–44] Die so gemessenen Geschwindigkeiten erlauben die Berechnung einer Gleichgewichtsdissoziationskonstanten in der Größenordnung von 10 pM sowohl für GDP als auch für GTP.^[43–45] Die Bindungsaffinität hängt in hohem Maße von der Gegenwart

von Mg^{2+} -Ionen ab. Fehlen diese, so steigt die Dissoziationsgeschwindigkeit hundertfach, begleitet von einem Ansteigen der Gleichgewichtskonstante.^[46, 47]

Die GTPase-Reaktion ist mit 0.02 min^{-1} an sich sehr langsam und wird durch GTPase aktivierende Proteine stark beschleunigt (siehe Abschnitte 2.5 und 3.4). Wie alle anderen biologischen Phosphoryltransferreaktionen hängt auch sie stark von der Anwesenheit von Mg^{2+} ab. Die Spezifität der Guaninnucleotidbindung ist so hoch, dass kein anderes Standardnucleotid eine einfach zu messende Bindung eingeht. Kinetischen Messungen zufolge ist die Affinität für Adennucleotide mindestens sechs Größenordnungen niedriger.^[48] Kleine Veränderungen im Guaninringsystem führen zu drastischen Effekten bei der Affinität: Xanthosin, dessen 2-Aminogruppe durch ein Sauerstoffatom ersetzt wurde, bindet mit 280fach geringerer Affinität, und ein Inosinnucleotidphosphat, dem die 2-Aminogruppe fehlt, wird ähnlich schwach gebunden.^[48] Ebenso ist die β -Phosphatgruppe für eine hochaffine Bindung notwendig: GMP bindet mit um sechs Größenordnungen schlechterer Affinität.^[43, 48]

Die dreidimensionale Struktur von Ras wurde mit zwei verkürzten Varianten des H-Ras-Proteins bestimmt, die entweder an Position 166^[49, 50] oder 171^[51, 52] enden. Die Struktur des gesamten Proteins wurde nicht gelöst, auch wenn über Kristalle des Proteins berichtet wurde.^[52] Die Struktur des Proteins besteht aus einem sechssträngigen gemischten β -Faltblatt und fünf α -Helices auf beiden Seiten des Faltblattes (Abbildung 1 A). Diese Struktur findet sich in allen üblichen GTP-bindenden Proteinen einschließlich der wesentlich größeren heterotrimeren G-Proteine oder des Biosynthese-Elongationsfaktors Tu (EF-Tu; das erste GTP-bindende Protein, dessen Struktur gelöst wurde) – man nennt sie die G-Domänen-Faltung.

Auch wenn bereits einiges über die konservierten Sequenzen von GTP-bindenden Proteinen bekannt war (Abbildung 1 B), konnte die Rolle der konservierten Sequenzelemente erst angemessen gewürdigt werden, nachdem die erste dreidimensionale Struktur gelöst worden war.^[53] Es überraschte nicht, dass diese Sequenzen stets an der Bindung von Guaninnucleotiden, der Hydrolyse von GTP und/oder am Mechanismus des Konformationswechsels beteiligt sind. Sie wurden G-Motive genannt (G1 bis G4)^[54, 55] oder auch nach ihrer Funktion PM- und G-Motive, je nachdem, ob sie an der Bindung des Phosphats und des Mg^{2+} -Ions oder der Guaninbase beteiligt sind.^[56] Das Netz der Wechselwirkungen in der Nucleotid-bindenden Region ist in Schema 5 gezeigt.

Das PM1-Motiv $\text{G}^{10}\text{xxxGKS/T}$ bildet eine Schleife (L1 in Ras), auch P-Loop genannt, die an der Bindung der geladenen Phosphatgruppen beteiligt ist. Über seinen vollkommen konservierten Lysinrest bildet dieses Motiv eine ringförmige Struktur, die sich eng um das β -Phosphat von GDP/GTP wickelt. Die Stickstoffatome des Hauptstrangs der Aminosäuren 13–16 weisen in Richtung der negativ geladenen Phosphatgruppen und schaffen so – zusammen mit der Seitenkette von Lys16 – eine positiv polarisierte Umgebung für diese

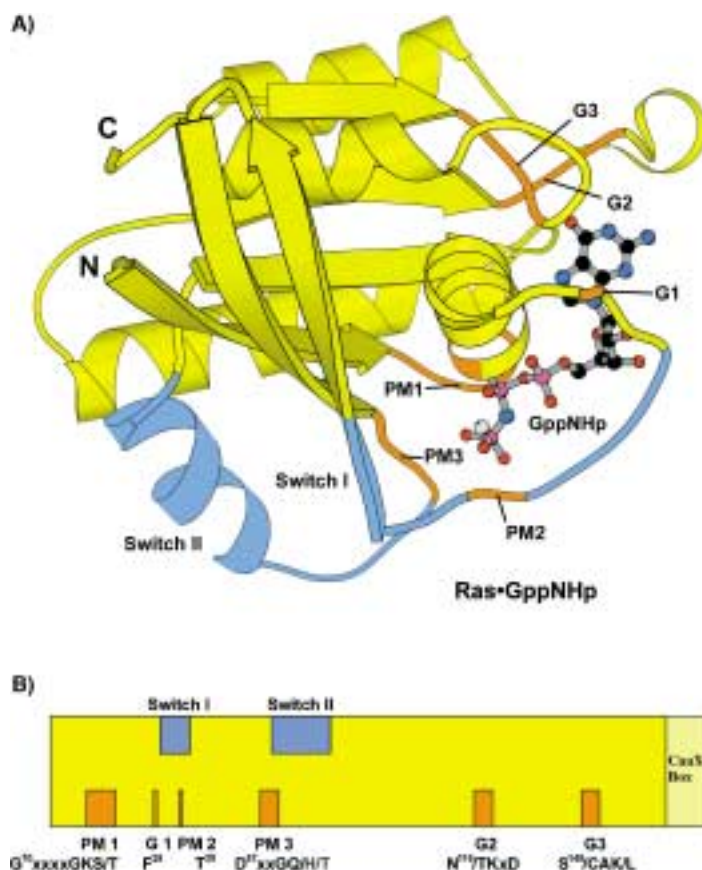
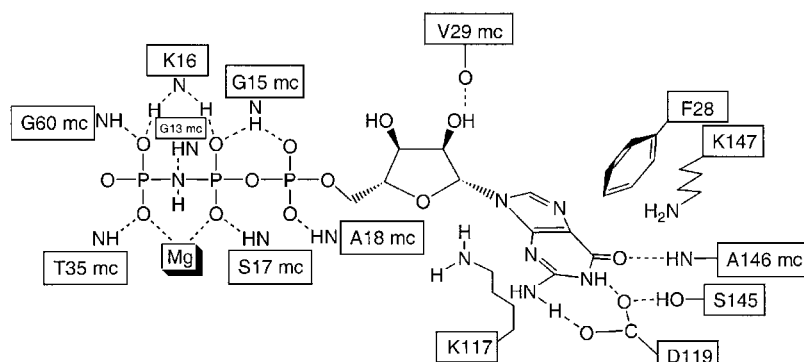


Abbildung 1. Primär- und Tertiärstruktur von Ras. A) Bänderdarstellung von Ras in der Triphosphatform (als GppNHp-Komplex) mit den konservierten Sequenzelementen aller GTP-bindenden Proteine (braun) um das Nucleotid herum. Die beiden Regionen von Ras mit unterschiedlichen Strukturen in den beiden Formen mit GTP bzw. GDP, die Switch-I- und -II-Region, sind blau dargestellt. N- und C-Terminus der Polypeptidkette sind hervorgehoben. B) Lineare, schematische Darstellung von Ras mit der Lage der konservierten Sequenzelemente und der Switch-Regionen (Farbkodierung wie in A). Die Struktur in A) zeigt nur die eigentliche G-Domäne, der die C-terminale Verlängerung mit der CAAX-Box fehlt; diese wird für die biologische Funktion absolut benötigt, ist aber für die hier diskutierten strukturellen und biochemischen Eigenschaften nicht von Bedeutung.

Ladungen. Die dem Lysinrest folgende Aminosäure (Ser/Thr) koordiniert im GTP- und im GDP-gebundenen Zustand den wichtigen Cofaktor Mg^{2+} . Ersetzt man ihn durch Ala oder Asn, so modifiziert man die Wechselwirkung zwischen Pro-



Schema 5. Wechselwirkungen des an Ras gebundenen Triphosphat-Analogons GppNHp mit ausgewählten konservierten Aminosäuren von Ras. mc = Peptidhauptkette.

tein, Metallion und Nucleotid so schwerwiegend, dass die Affinität zu Guaninnucleotiden sehr stark herabgesetzt wird.^[57–59] Als Resultat der schwachen Affinität zu Guaninnucleotiden verfügt das Protein nun über eine relativ hohe Affinität zu Guaninnucleotid-Austauschfaktoren (bezogen auf die zu GDP/GTP), was dazu führt, dass die so komplexierten GEFs nicht mehr für die Reaktion mit normalen Ras-Molekülen zur Verfügung stehen. Derart mutiertes Ras kann daher als dominant negativer Inhibitor fungieren.

Auch wenn viele Vorschläge für Konsensussequenzen in den Regionen um den konservierten Threoninrest T³⁵ des PM2-Motivs gemacht wurden, ist keine dieser Aminosäuren – mit Ausnahme des Threonins selbst – wirklich konserviert. Dieser Threoninrest ist im GTP-Zustand ein direkter Ligand für das Mg²⁺-Ion, bindet die γ -Phosphatgruppe von GTP und ist eine Schlüsselaminosäure, die die Konformationsänderung nach der GTP-Hydrolyse auslöst.^[60] Die Mutation dieser Aminosäure zu Alanin reduziert die Affinität zum Nucleotid und verhindert die Aktivierung durch GAP – möglicherweise aufgrund der inkorrekten Koordination des Mg²⁺-Ions.^[59]

Im PM3-Motiv D⁵⁷xxGQ/H/T ist der Aspartatrest an der Bindung des Mg²⁺-Ions über ein Wassermolekül beteiligt. Der Glycinrest ist über eine Wasserstoffbrücke zur γ -Phosphatgruppe koordiniert, eine weitere Wechselwirkung, die für den Wechsel der Konformation nach der GTP-Hydrolyse verantwortlich ist. Die meisten GTP-bindenden Proteine enthalten einen Gln-Rest, der entscheidend für die GTP-Hydrolyse ist. Er ist jedoch bei Rap durch Thr und bei Elongationsfaktoren durch His ersetzt.

Die das G1-Motiv bildende Aminosäure Phe oder Tyr ist nur in Proteinen der Ras-Superfamilie konserviert. Sie ist senkrecht zur Guaninbase angeordnet und sorgt zusammen mit dem konservierten Lys-Rest des G2-Motivs für starke hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Protein und Base. Mutiert man diese Aminosäure zu Leucin, so wird die Bindung des Nucleotids drastisch geschwächt und die Dissoziationsgeschwindigkeit dementsprechend erhöht.

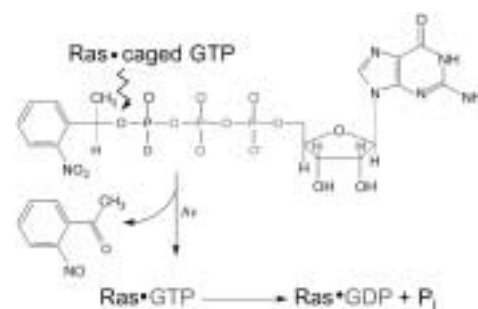
Im G2-Motiv N¹¹⁶/TKxD liegt die Guaninbase des Nucleotids in einer hydrophoben Tasche. Spezifische hydrophobe Kontakte, ionische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken stabilisieren ihre Bindung. Diese verschiedenen Unterregionen der Nucleotidbindungsstelle sind über Asn und Lys verknüpft. Der Aspartatrest bildet eine doppelte Wasserstoffbrücke mit der Guaninbase und ist hauptsächlich für die hohe Spezifität des Proteins für Guaninnucleotide verantwortlich. Viele der Aminosäuren in G2 wurden in mit Ras verwandten Proteinen mutiert, was stets eine raschere Dissoziation der Nucleotide vom Protein nach sich zog. Solche Mutanten sind aufgrund ihrer schnellen Austauschreaktion aktiver und/oder dominant negativ. Durch Mutation von Asp nach Asn wird die Affinität für Guaninnucleotide um einige hundert Mal verringert, die Affinität für Xanthosinnucleotide wird aber ähnlich erhöht,^[45, 61, 62] da bei deren Bindung das doppelte Wasserstoffbrückenbindungssystem erhalten bleibt. Diese Art von Mutanten erwies sich als sehr nützlich bei der Untersuchung der Rolle von EF-Tu,^[63] Ras,^[45, 64] Rab5^[65] und FtsY.^[66]

Das G3-Motiv S¹⁴⁵/CAK/L ist mit Ausnahme des Alaninrestes in der Ras-Superfamilie nicht vollkommen konserviert. Es scheint eine Helferfunktion bei der Bindung der Guaninbase zu haben, da seine Seitenketten an keiner direkten Wechselwirkung mit der Base beteiligt sind. Stattdessen ist der Lys- bzw. Leu-Rest an der Stabilisierung der Position von Phe28 (dem G1-Motiv) durch eine hydrophobe Wechselwirkung beteiligt. Ser145 bildet eine Wasserstoffbrücke zu Asp119. Das Stickstoffatom der Hauptkette von Ala146 bildet eine starke Wasserstoffbrücke mit dem O6-Atom der Base. Diese Wechselwirkung ist ein weiterer Faktor, der für die Spezifität der Guaninnucleotidbindung verantwortlich ist, da Adenin aus sterischen Gründen nicht aufgenommen werden kann.

Die Struktur von Ras wurde in der Tri- und der Diphosphat-Form^[49–52, 67] unter Verwendung von GTP-Analoga wie GppNHP^[49, 50] und Gpp(CH₂)_p^[51] (zwei nicht oder nur langsam hydrolysierenden Analoga), bei denen das die β - und γ -Phosphate verbindende Sauerstoffatom durch eine NH- oder CH₂-Einheit ersetzt ist, aufgeklärt. Dabei wurde erkannt, dass die Strukturänderungen auf zwei kleine Gebiete beschränkt sind, die Switch I und II (Schalter I und II) genannt wurden.^[51] Die Strukturen enthüllten weiterhin, wie die Konformationsänderung ausgelöst wird, da beide Schalterregionen über zwei invariante Aminosäuren an das γ -Phosphat gebunden sind: Switch I über Thr35 und Switch II über Gly60.^[60] Die Abspaltung des γ -Phosphatrestes im Verlauf der GTP-Hydrolyse führt zu einer Entspannung der Struktur dieser Regionen, die dann die neue Konformation in einer Weise annehmen können, die man auch als Gespannte-Feder-Mechanismus (loaded spring mechanism) bezeichnen kann.^[68]

Die Struktur von Ras wurde auch mit verschiedenen Analoga von Guaninnucleotiden aufgeklärt, wie z. B. dem fluoreszierenden Derivat mantGppNHP^[69] (Schema 4) und cagedGTP,^[67] das eine photolabile Schutzgruppe (cage) am γ -Phosphatrest trägt (Schema 6). Es wurden Kristalle vom Ras·cagedGTP-Komplex hergestellt. Durch anschließende Blitzphotolyse konnte die Schutzgruppe abgespalten und so ein Ras·GTP-Komplex erhalten werden, der dem Enzym·Substrat-Komplex entspricht.^[67, 70] In einer Erweiterung dieser Studien wurde es sogar möglich, Ras·GTP im Kristall zu Ras·GDP zu hydrolysieren.

Ebenso wurde eine Reihe von Ras-Mutanten strukturell untersucht, insbesondere die onkogenen Mutanten G12V, G12R, G12D und Q61L.^[52, 71, 72] Ihre Gesamtstrukturen

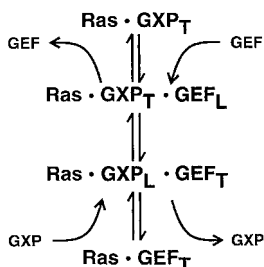


Schema 6. Struktur von cagedGTP. Durch Photolyse von kristallinem Ras·cagedGTP wurden Kristalle erhalten, anhand derer die Struktur von Ras·GTP, dem Michaelis-Menten-Komplex der GTPase-Reaktion, bestimmt werden konnte.

gleichen der des Wildtyps. Auch wenn in allen dieser Strukturen kleine Veränderungen in der Umgebung des γ -Phosphats beobachtet wurden, konnte ihre Analyse keine konsistente Erklärung für den Verlust der GTPase-Fähigkeit dieser Mutanten geben.

2.3. Der Einschaltmechanismus

Auch wenn Ras im Prinzip durch die Inhibierung der GAP-vermittelten GTPase-Reaktion eingeschaltet werden kann,^[73] so ist die Aktivierung über die Wechselwirkung mit GEFs der vorherrschende Modus. Die Reihe identifizierter Ras-spezifischer GEFs kann in zwei Hauptkategorien eingeteilt werden (für eine Übersicht siehe Lit. [74]). Die erste Kategorie ist die von SOS, eine Kurzbezeichnung für die *son-of-sevenless*-Mutation in *Drosophila*, von der es zwei Isoformen bei Säugern gibt. SOS enthält Polyprolin-Motive, die für seine Wechselwirkung mit SH3-Domänen wie denen des Adapterproteins Grb2 notwendig sind.^[75–79] Diese Austauschfaktoren werden durch die Bindung des SOS·Grb2-Komplexes an Tyrosinphosphorylierte Rezeptoren aktiviert. Die RasGEFs der zweiten Klasse, die drei Isoformen und einige Spleißvarianten enthält, verfügen über eine Reihe von Domänen, von denen angenommen wird, dass sie an sekundäre Botenstoffe binden und von diesen aktiviert werden, wie z.B. Ca^{2+} und Ca^{2+} -Calmodulin.^[80, 81] Ein weiterer Austauschfaktor dieser Gruppe wird durch Diacylglycerin aktiviert.^[82, 83] Beide Typen von GEFs enthalten eine Cdc25-Domäne, die zuerst im Hefeprotein Cdc25 entdeckt wurde. Diese Domäne ist für einen schnellen Guaninnucleotidaustausch notwendig und hinreichend.^[84] Eine weitere Domäne,



Schema 7. Die von GEF katalysierten Nucleotidaustauschreaktionen an Ras. Der Ras·GXP_T-Nucleotid-Komplex, in dem das Nucleotid noch immer fest gebunden ist, wechselwirkt mit GEF unter Bildung eines ternären Komplexes mit lose (L) gebundenem GEF. Durch einen Konformationswechsel entsteht ein Komplex mit lose gebundenem Nucleotid und fest gebundenem GEF, der nun in einen nucleotidfreien binären Komplex übergehen kann. Die umgekehrte Reaktionsfolge liefert wieder den Ras·Nucleotid-Komplex. Unter zellulären Bedingungen wird dies in den allermeisten Fällen Ras·GTP sein.

REM (Ras Exchange Motif), befindet sich in variabler Distanz von der Cdc25-Domäne.^[85] Der ermittelten Struktur zufolge (siehe unten) ist letztere hauptsächlich für die Stabilität der katalytischen Domäne verantwortlich.

GEFs erhöhen die Dissoziationsgeschwindigkeit drastisch, im Falle von Ras und Ran unter Sättigungsbedingungen um mehrere Größenordnungen, so dass das Nucleotid durch die Verringerung der Affinität in weniger als einer Sekunde abdissoziiert.^[84, 86, 87] Dem in Schema 7 gezeigten Minimalmodell für die Reaktion zufolge nähert sich der GEF dem binären Ras·GDP-Komplex und bildet mit ihm einen ternären Komplex.^[84, 86–90] Danach geht die Nucleotidbindungstasche von einer fest (GXP_T) in eine locker bindende Konformation (GXP_L) über, sodass sich das Nucleotid

aus dem ternären Komplex Ras·GDP·GEF unter Bildung des Ras·GEF-Komplexes löst. Durch die Bindung von GTP, der in der Zelle vorherrschenden Nucleotidform, bildet sich ein neuer ternärer Komplex, aus dem durch Abspaltung des GEF Ras·GTP entsteht.

Es sollte hier betont werden, dass die Guaninnucleotid-Austauschreaktion im Prinzip in beide Richtungen (GDP gegen GTP und umgekehrt) ablaufen kann, da alle Teilreaktionsschritte richtungsunabhängig sehr schnell ablaufen.^[84, 86, 87] Im Falle von EF-Tu (R. Goody, unveröffentlichte Ergebnisse) oder Ran^[86, 87] ist die Reaktion in Richtung der Bildung des GDP-Komplexes sogar schneller. Da der GEF lediglich als Katalysator fungiert, wird das Ergebnis der Reaktion allein von der relativen Affinität der GTP-bindenden Proteine, der Konzentration von GDP im Vergleich zu der von GTP in der Zelle (oder in dem jeweiligen Kompartiment der Zelle, in dem die Reaktion abläuft) und der Konzentration der Komponenten, die an die Komplexe mit GDP oder GTP binden, bestimmt. Diese Abhängigkeiten bestehen natürlich nur, wenn anderer Hemmnisse – wie die Aufnahme der Produkte in die Zellmembran –, die die Reaktion in Richtung des GTP-Komplexes lenken, nicht bestehen.

Sehr wenig ist bislang über den kinetischen Mechanismus der GEF-Reaktion bekannt. Die Existenz eines binären Komplexes aus GEF und dem GTP-bindenden Protein, die aufgrund des bereits beschriebenen EF-Tu·EF-Ts-Komplexes erwartet werden konnte, konnte für Ras·Cdc25 nachgewiesen werden.^[84, 88–90] Es wurde postuliert, dass der geschwindigkeitslimitierende Schritt der gesamten durch Cdc25 katalysierten Austauschreaktion an Ras die Konformationsänderung ist, bei der das Nucleotid von einer fest zu einer lose gebundenen Konformation übergeht. Die Geschwindigkeit dieser Reaktion ähnelt der des zweiten Schrittes der zweistufigen Bindung eines Nucleotids an Ras, bei dem der zunächst gebildete Komplex mit locker gebundenem Nucleotid ($K_D \approx 10 \mu\text{M}$) zu dem mit fest gebundenem ($K_D \approx 10 \text{pM}$) isomerisiert.^[43] Dies spricht für eine ähnliche Umlagerung bei Bindung eines Nucleotids an nucleotidfreies Ras oder den binären Ras·GEF-Komplex. Die Untersuchungen mit Cdc25 ergaben weiterhin, dass die Affinität der Cdc25-Domäne für Ras·GDP in der Größenordnung von einigen hundert μM liegt.^[84] Dies erklärt, warum es nicht zu nutzlosem Nucleotidaustausch kommt, solange nicht der Austauschfaktor zusammen mit Ras in der Membran colokalisiert ist.

Die Struktur des Ras·SOS-Komplexes wurde von Boriak-Sjodin et al.^[91] aufgeklärt (Abbildung 2). Sie erlaubt wichtige Einsichten in den Mechanismus der Aktivierung von Ras. Die kürzeste Domäne von Cdc25 – und wahrscheinlich auch von SOS –, die notwendig und ausreichend für eine effiziente katalytische Aktivität ist, umfasst 248 Aminosäuren (R. H. Cool, A. Wittinghofer, unveröffentlichte Ergebnisse). Die meisten der detaillierten kinetischen Studien wurden mit Fragmenten ähnlicher Größe unternommen.^[84, 89, 90] Das bei der Kristallisation von SOS verwendete Fragment umfasste 485 Aminosäuren, die den Aminosäuren 564–1049 des menschlichen SOS-Austauschfaktors entsprechen. Dieses Fragment enthält auch das REM-Motiv,^[85] das auch CR0 (Conserved Region 0)^[91] genannt wird. Sequenzanalysen

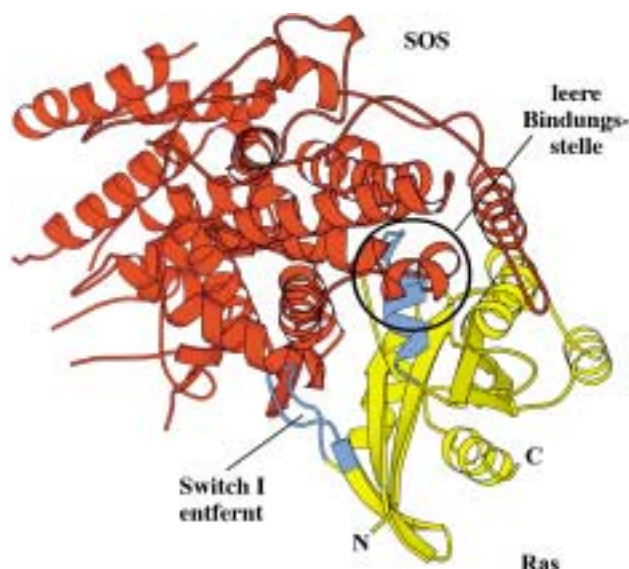


Abbildung 2. Bänderdarstellung des binären Ras·SOS-Komplexes, eines Intermediats der Austauschreaktion gemäß Schema 7. Die Farbkodierung von Ras entspricht der in Abbildung 1, SOS ist rot dargestellt, die Nucleotidbindungsstelle von Ras ist durch einen Kreis gekennzeichnet.

zufolge ist diese Region in Cdc25-ähnlichen Ras-Austauschfaktoren konserviert, befindet sich aber bei verschiedenen Austauschfaktoren für Ras, Ral und Rap in unterschiedlichen Entfernungen zur katalytischen Domäne. Sie unterstützt offenbar eine hervorstehende helicale Haarnadelstruktur der katalytischen Domäne und ist wahrscheinlich verantwortlich für deren Stabilität, da kleinere Fragmente von SOS (wahrscheinlich auch von Cdc25) eher labil sind. Die katalytische Domäne beinhaltet die konservierten Regionen SCR 1–3 und ist nahezu vollständig α -helical (Abbildung 2).

Die katalytische Domäne von SOS wird als längliche Schüssel beschrieben, in deren Mitte Ras gebunden wird. Die Struktur des Ras·SOS-Komplexes lässt erkennen, dass der P-Loop, die Switch-I- und -II-Regionen sowie die Region um $\beta 3$ von Ras an der Wechselwirkung beteiligt sind, wie es bereits von mehreren Arbeitsgruppen aufgrund von Mutationsanalysen vorhergesagt worden war.^[92, 93] Die hervorstechendsten – wenn auch hinsichtlich der Bindungsenergie des binären Komplexes nicht notwendigerweise die wichtigsten – Wechselwirkungen zwischen Ras und SOS betreffen die Switch-I-Region und die hervorstehende helicale Haarnadelstruktur. Die Switch-I-Region ist vollständig aus ihrer normalen Position herausgeklappt, sodass die mit der Base und der Phosphatgruppe wechselwirkenden Aminosäuren wie Phe28 und Thr35 aus ihrer Position in der Bindungstasche entfernt werden. Dabei wird die Region durch die helicale Haarnadelstruktur stabilisiert. Die weiteren wichtigen Merkmale der Bildung des binären Komplexes betreffen fast alle Aminosäureseitenketten der Switch-II-Region, die direkte Wechselwirkungen mit den Helices B, D, E und G von SOS eingeht. Die Switch-II-Region ist im Ras·SOS-Komplex sehr gut strukturiert und weist Merkmale auf, die nicht mit der Bindung von Nucleotiden zu vereinbaren sind. Zu diesen Merkmalen zählen das Eindringen eines Glutaminsäure- (Glu942) und eines hydrophoben Leucinrestes (Leu938) in

die Mg^{2+} - und Phosphat-bindende Region, die Besetzung der Mg^{2+} -Bindungsstelle mit dem Carbonyl-Sauerstoffatom von Ala59 und die vollständige Neuordnung des $\beta 3$ - $\alpha 2$ -Loops, sodass Gly60 und Lys16 stark mit Glu62 von Ras wechselwirken. Von Glu62 ist bekannt, dass es für die Austauschreaktion mit Cdc25 und Sdc25 essentiell ist.^[94] Lys16 ist besonders wichtig für die Bindung des Phosphats, da er mit einem Sauerstoffatom der β -Phosphatgruppen im GDP- und mit denen der $\beta\gamma$ -Phosphatgruppen im GTP-Komplex wechselwirkt. Er ist in allen P-Loop-Proteinen invariant.^[95] Wird er in Ras mutiert, ist die Affinität zu Guaninnucleotiden drastisch herabgesetzt.^[96] Der Struktur des binären Ras·SOS-Komplexes zufolge ist die basenbindende Region von Ras geöffnet, während die phosphatbindende Region durch viele Wechselwirkungen mit SOS an der Bindung gehindert wird. Um also wieder an Ras zu binden, muss sich das Nucleotid über die Bindungsstelle für die Base nähern, einen Konformationswechsel induzieren, der SOS freisetzt und so eine feste Bindung auch in der phosphatbindenden Region induziert.^[91, 97] Eine derartige Strukturänderung könnte der geschwindigkeitsbestimmenden Reaktion erster Ordnung entsprechen, wie sie in kinetischen Experimenten identifiziert wurde.^[84]

2.4. Wechselwirkungen mit Effektoren

Durch GTP-Bindung aktiviertes Ras wechselwirkt mit Effektoren. Der erste isolierte Effektor war die Protein-Kinase Raf, von der die drei Isoformen Raf-1, A- und B-Raf existieren. Bei ihnen handelt es sich um 70–80 kDa große Proteine mit einer C-terminalen Kinasedomäne und einer aminoterminalen regulatorischen Region, die aus vielen Modulen besteht. Diese halten die Kinase über einen noch nicht vollständig verstandenen Mechanismus im inaktiven Zustand.^[10–12] Das am besten verstandene Modul im regulatorischen N-Terminus ist die Ras-bindende Domäne (RBD), die aus 80 Aminosäuren besteht^[98] und eine stabile, unabhängig faltende Domäne ist.^[99, 100] Sie ist notwendig und ausreichend, um mit Ras in GTP-abhängiger Weise zu wechselwirken. Mutierte Aminosäuren in der Effektorregion, die die biologische Aktivität von Ras blockieren, sind gleichfalls nicht in der Lage, mit RBD zu wechselwirken, was die Annahme stützt, dass die isolierte Domäne über die gleichen Eigenschaften verfügt wie die im intakten Protein.^[98, 101–104] Es wird angenommen, dass die Hauptfunktion von Ras in der durch die Bindung an RBD vermittelten Rekrutierung von Raf an die Plasmamembran liegt. An der Membran wird die Protein-Kinase in einer Kette von Ereignissen aktiviert, die allosterische Wechselwirkungen, Phosphorylierungen und Wechselwirkungen mit anderen Proteinen wie 14-3-3 beinhaltet.^[11, 12] Eine weitere regulatorische Domäne am N-Terminus von Raf ist die Cystein-reiche Domäne (CRD), eine zinkbindende Domäne, von der ebenfalls angenommen wird, dass sie mit Ras und zusätzlich mit 14-3-3-Proteinen und Lipiden wechselwirkt. Ihre Rolle bei der Aktivierung und/oder Deaktivierung der Kinaseaktivität wird debattiert.^[105–112]

Die Struktur der Ras-bindenden Domäne von freiem Raf-1 wurde NMR-spektroskopisch^[113, 114] und die von Raf-1 im

Komplex mit dem Ras-homologen Protein Rap1A röntgenkristallographisch aufgeklärt.^[115] Mit einer Sequenzidentität von 50 % ist Rap1A ein zu Ras stark homologes Protein. Die wichtigen Aminosäuren in der Effektorregion sind nahezu identisch. Raf-RBD weist die gleiche Struktur wie Ubiquitin auf – eine offensichtlich stabile Struktur, die für eine Reihe von Aufgaben verwendet werden kann. An der Wechselwirkung mit Ras ist nur die Switch-I- und nicht die Switch-II-Region beteiligt (Abbildung 3 A). Zwischen den beiden Proteinen bildet sich ein Inter-Protein- β -Faltblatt mit einigen Hauptkettenwechselwirkungen zwischen den Strängen. An der Mehrzahl der Wechselwirkungen sind jedoch hydrophile Seitenketten beteiligt, wobei Rap hauptsächlich negativ und

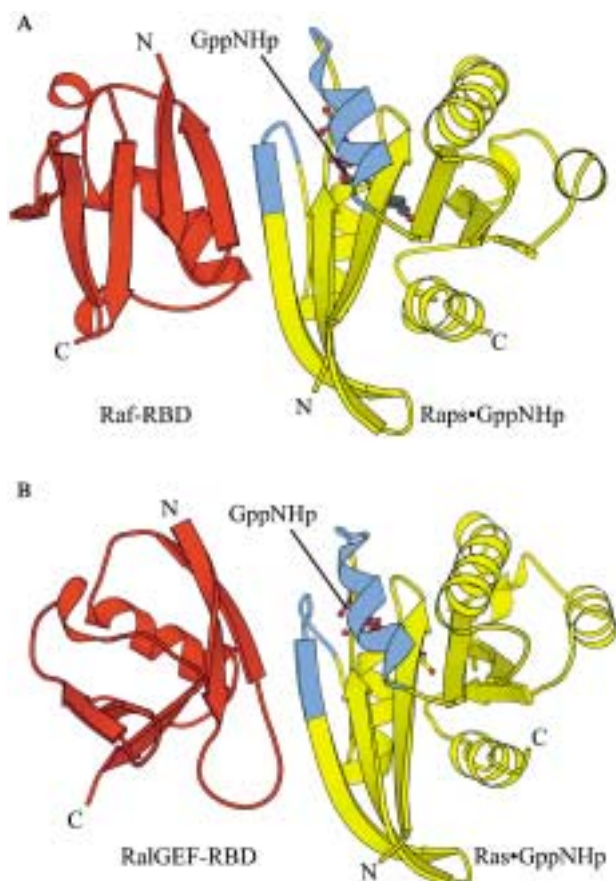


Abbildung 3. A) Bänderdiagramm des Raps·Raf-RBD-Komplexes. Raps ist ein stark Ras-homologes Protein mit identischen Aminosäuren in der Wechselwirkungsfläche des Komplexes und Raf-RBD die Ras-bindende Domäne des Ras-Effektors Raf-Kinase. B) Bänderdiagramm des Ras·RalGEF-RBD-Komplexes. Obwohl es keine Sequenzhomologien zwischen den Ras-bindenden Domänen verschiedener Effektoren gibt, weisen sie eine ähnliche Tertiärstruktur auf und wechselwirken mit Ras in gleicher Weise, obgleich sie dabei an verschiedene Aminosäureseitenketten von Ras binden. Die Effektoren sind rot dargestellt.

Raf-RBD mehrheitlich positiv geladene Aminosäuren beisteuert. Mutationen, die zu einer Blockierung der biologischen Ras-Aktivität führen, betreffen tatsächlich Aminosäuren, die bei der Bildung der Komplexwechselwirkungsfläche in der Effektorregion eine Rolle spielen. Die Struktur eines Komplexes aus Raf-RBD und einer Mutante von Rap, die Ras noch ähnlicher ist (Raps; Abbildung 3 A), machte deutlich, dass die Hauptunterschiede zwischen der Ras-Raf- und

der Rap-Raf-Wechselwirkung sowie der Grund für die geringere Affinität^[116, 117] zwischen Rap und RBD in einer Ladungsumkehr in der Effektorregion liegen: Anstelle eines Glutaminsäurerestes in Ras findet sich in Rap ein Lysinrest.

Die CRD-Struktur wurde NMR-spektroskopisch gelöst.^[118] Wie aufgrund der verdächtigen Anordnung der Cysteinreste bereits erwartet werden konnte, handelt es sich um ein Zink-koordinierendes Protein von hoher struktureller Ähnlichkeit mit der Glycerin-bindenden Domäne der klassischen Protein-Kinase C.^[119]

RalGEF und seine Isoformen wurden ebenfalls detailliert biochemisch und strukturell untersucht. Sie sind ca. 600–800 Aminosäuren groß und enthalten am C-terminalen Ende ein Motiv, das an Ras·GTP bindet.^[32–34] Es konnte gezeigt werden, dass ein kleines, 100 Aminosäuren großes Modul des C-Terminus notwendig und ausreichend ist, um an Ras in GTP-abhängiger Weise zu binden.^[116] Es wurde ebenfalls gezeigt, dass diese Ras-bindende Domäne von RalGEF an Rap·GppNHp mit hoher und an Ras·GppNHp mit niedrigerer Affinität bindet. Wieder ist Aminosäure 31 in Rap/Ras für den größten Teil der Spezifität verantwortlich.^[116] Die Struktur der Domäne wurde NMR-spektroskopisch^[120] und röntgenkristallographisch aufgeklärt.^[121] Diesen Untersuchungen zufolge weist RalGEF-RBD die gleiche Ubiquitin-Faltung auf wie Raf-RBD, auch wenn keine signifikanten Sequenzhomologien bestehen. Die Strukturen der Ras-bindenden Domäne von Rlf^[122] und Rgl^[123] wurden ebenfalls aufgeklärt, sie zeichnen sich – was nicht überraschte – durch die gleiche Topologie aus.

Die Strukturen der Komplexe von RalGEF-RBD mit Mutanten von Ras^[124] oder mit Ras^[125] wurden röntgenkristallographisch aufgeklärt, es besteht bei diesen Komplexen die gleiche Wechselwirkung über ein Inter-Protein- β -Faltblatt wie bei Ras·Raf-RBD (Abbildung 3 B). Allerdings sind die seitens Ras beteiligten Aminosäuren nun andere. Dies war nicht völlig unerwartet, da bereits Aminosäuren in der Effektorregion bekannt waren, die die Wechselwirkung mit einer spezifischen Untergruppe von Effektoren blockieren, ohne dabei die mit anderen zu behindern. Auch wenn diese Mutationen, die zu einem partiellen Verlust der Funktion führen, nicht vollkommen spezifisch sind, wird generell angenommen, dass die E37G-Mutation die Ras-Raf-Wechselwirkung blockiert, die Ras-T35S-Mutation die zwischen Ras und RalGDF und die Y40C-Mutation beide Wechselwirkungen, nicht aber die mit PI(3)K.^[27, 126–131] Die Strukturen lassen eine schwache Wasserstoffbrücke zwischen Glu37 von Ras und RalGEF erkennen, jedoch keine zwischen der Ras-E31K-Mutante und RalGEF. Allerdings besteht zwischen Glu37 und Raf-RBD eine starke Wasserstoffbrücke, was die biologischen Befunde erklärt. Tyr40 bildet einen beträchtlichen Teil der Bindungswechselwirkungsfläche von Ras·RalGEF, was den Verlust an Affinität erklärt, und scheint indirekt an der Ras·Raf-RBD-Wechselwirkungsfläche beteiligt zu sein (Vetter et al., unveröffentlichte Ergebnisse). Die Spezifität der Bindung an Ras im Vergleich mit der von Rap im Ras-Signaltransduktionsweg ist auf die Ladungsabstoßung zwischen Glu31 und einer Reihe von sauren Aminosäuren von RalGEF-RBD zurückzuführen.^[124, 125] Mutationsanalysen zufolge geht das Vermögen, zwischen Ras und Rap zu

unterscheiden, durch Mutation einer dieser drei sauren Aminosäuren verloren.^[132]

Über die Bindungswechselwirkungen mit anderen Effektoren ist noch nicht viel bekannt. Dennoch ist es aufgrund von Mutationsdaten evident, dass PI(3)K ebenfalls über die Effektorregion wechselwirkt, wenn auch auf andere Weise, wie Mutationen, die zu einem partiellen Verlust der Funktion führen, belegen. Auch wenn die Ras-bindende Domäne und die wechselwirkenden Aminosäuren auf Seiten der katalytischen p110-Untereinheit der PI(3)-Kinasen identifiziert werden konnten,^[128, 133] so konnte bislang keine unabhängig faltende Domäne exprimiert werden. Die Struktur der katalytischen p110-Untereinheit der PI(3)-Kinase in der γ -Isoform zeigt eine Ras-bindende Domäne von großer Homologie zu der von Raf und RalGEF. Computersimulationen deuten auf einen ähnlichen Wechselwirkungsmodus hin.^[134] Die Struktur lässt allerdings auch erkennen, dass die RBD eng an die Kinasedomäne gekoppelt ist, was auf eine allosterische Ras-vermittelte Kontrolle der enzymatischen Aktivität hinweist. AF6 ist ein weiterer mutmaßlicher Effektor,^[135, 136] der vermutlich in ähnlicher Weise wie Raf und RalGEF bindet, da er ³¹P-NMR-Messungen zufolge bei der Bindung an Ras·GppNHp eine ähnliche Konformation der beweglichen Effektor-Loop-Region induziert.^[137]

2.5. Die Ausschaltreaktion

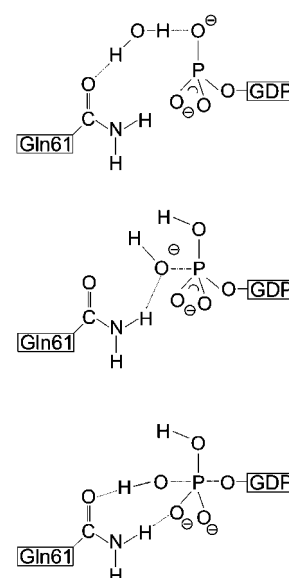
Der wichtigste Aspekt der Biochemie von Ras in physiologischer und medizinischer Hinsicht ist die GTPase-Reaktion. Dies wird daran deutlich, dass onkogene Varianten von Ras die Fähigkeit zur intrinsischen und – was noch wichtiger ist – zur GAP-stimulierten GTPase-Reaktion verloren haben. Aus diesem Grund war der GTPase-Mechanismus Gegenstand einer hitzigen Debatte.

In der hochaufgelösten Struktur von Ras·GppNHp befindet sich ein nucleophiles Wassermolekül in der Nähe der γ -Phosphatgruppe. Daher wurde es als angreifendes Nucleophil angesehen.^[50] Des Weiteren wurde deutlich, dass Gln61 sich in der Nähe der γ -Phosphatgruppe und ein Carboxylatrest sich in Wasserstoffbrückendistanz zur Seitenkette von Gln61 befindet. Dies führte zu einer Hypothese, in der Gln61 als allgemeine Base dient, um das Nucleophil zu aktivieren.^[50] Einige experimentelle Daten stützten diese Ansicht.^[138, 139] Jedoch erschien diese Interpretation theoretischen Überlegungen,^[140] Befunden nach Einführung eines nichtnatürlichen Glutamin-Analogons mit noch niedrigerem pK_a -Wert in die Position von Gln61^[141] und einer Carboxylat-Mutationsanalyse^[142] zufolge unwahrscheinlich. Modellrechnungen führten zu dem Vorschlag, dass die γ -Phosphatgruppe, deren pK_a -Wert zu ca. 3 berechnet wurde, als Base fungieren könnte (Schema 8).^[141] Mutagenese- und NMR-Untersuchungen stützten diesen Vorschlag. In der Tat konnte eine lineare Freie-Energie-Beziehung zwischen dem pK_a -Wert der γ -Phosphatgruppe und der GTP-Hydrolysegeschwindigkeit festgestellt werden.^[142–144] Gleiches wurde für die GTPase-Reaktion der α -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins postuliert.^[145]

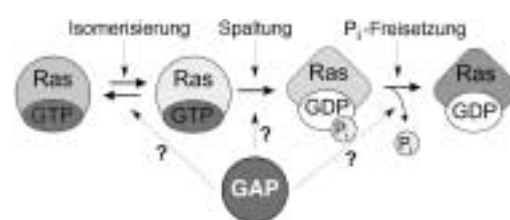
Da das langsame Ausschalten durch die intrinsische GTPase physiologisch weniger wichtig ist als die GAP-vermittelte Reaktion, war der Mechanismus der letzteren von beträchtlichem Interesse. GAP-Proteine wurden zuerst von Trahey und McCormick in einer bahnbrechenden Veröffentlichung beschrieben, in der sie zeigten, dass rekombinantes Ras·GTP in vitro eine Halbwertszeit von ca. 30 min hat, während es sehr schnell zu Ras·GDP hydrolysiert, sobald man es in Zellen mikroinjiziert.^[146] Das fragliche Protein beschleunigt dabei allerdings nur die Hydrolyse von Wildtyp-Ras, aber nicht die von onkogenem Ras. Seitdem wurden einige Ras-spezifische GAPs (RasGAPs) isoliert und kloniert. Die wichtigsten und am besten untersuchten

sind p120GAP^[147, 148] und das Produkt des Neurofibromingens, das für die genetisch bedingte Krankheit Neurofibromatose (Typ I) verantwortlich ist.^[149–152] Bei den RasGAPs handelt es sich um verschiedene Proteine unterschiedlicher Länge und Komplexität mit einer ca. 330 Aminosäuren langen Domäne, die allein die schnelle GTP-Hydrolyse auslösen kann.^[153, 154] Bei Neurofibromin scheint eine ca. 220 Aminosäure lange Domäne notwendig und ausreichend für die Beschleunigung der GTP-Hydrolyse zu sein.^[155]

Für die GAP-katalysierte GTPase-Reaktion von Ras konnte nach Sättigung von GAP oder Neurofibromin mit Ras·GTP in steigenden Konzentrationen und anschließender Auswertung nach Michaelis-Menten ein k_{cat} -Wert von 5–20 s^{−1} ermittelt werden, der damit ca. 10⁵-mal größer war als der der nichtstimulierten Reaktion.^[154, 156, 157] Da die Gesamtreaktion so stark beschleunigt wird, wurde diskutiert, welcher der einzelnen Reaktionsschritte geschwindigkeitsbestimmend ist und von GAP stimuliert wird (Schema 9). Die Originaldaten schienen anzudeuten, dass ein Konformationswechsel bei der intrinsischen Reaktion die Gesamtreaktionsgeschwindigkeit bestimmt.^[44] Daher war es verlockend anzunehmen,

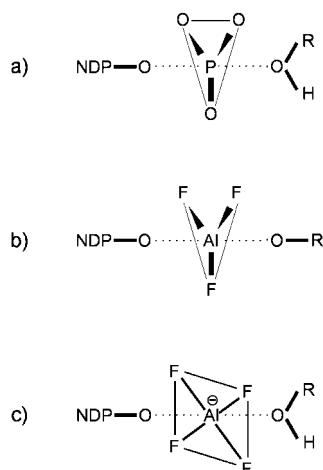


Schema 8. Vorschlag eines substratunterstützten Mechanismus der GTPase-Reaktion von Ras, in dem die γ -Phosphatgruppe selbst das nucleophile Wasser aktiviert und Gln61 den Übergangszustand stabilisiert.



Schema 9. Übersicht über die Teilschritte der GTPase-Reaktion von Ras. Es wird heute allgemein angenommen, dass die chemische Spaltung geschwindigkeitsbestimmend für die intrinsische GTPase-Reaktion von Ras ist und von GAP stimuliert wird.

dass GAP diese Konformationsänderung stimuliert. Ras wäre in diesem Fall eine schnelle GTPase, die GAP lediglich zur Aktivierung benötigt. Es wurden Daten veröffentlicht, die diese Annahme stützten, und solche, die sie widerlegten.^[158, 159] Darüber hinaus vertraten einige Autoren die Ansicht, dass Ras ein unvollständiges Enzym sei und chemische Gruppen von GAP benötigt, um schnell zu hydrolysieren.^[142, 159] Unterstützt wurde dieser Vorschlag durch Experimente mit Aluminiumfluorid, das in vielen enzymatischen Systemen den Übergangszustand der Phosphoryltransferreaktion (Schema 10) nachahmt.^[160] Es zeigte sich, dass Ras Aluminiumfluorid nur in Gegenwart stöchiometrischer Mengen von GAP bindet und dass ein invarianter Argininrest in GAP notwendig für diesen Effekt ist.^[161] Darüber hinaus ergaben Stopped-flow-single-turnover-Experimente, dass für die Katalyse von GAP, aber nicht für dessen Bindung an Ras, die Anwesenheit dieses Argininrestes nötig ist. Dies sprach für die notwendige Beteiligung zumindest einer Aminosäure von GAP an der Katalyse.^[155, 162]



Schema 10. Aluminiumfluorid-Komplexe sind (stabile) Mimetika des Übergangszustands der (enzymatischen) Phosphoryltransferreaktion. Kristallographischen Untersuchungen zufolge sind die planaren AlF_3 - oder AlF_4^- -Moleküle in diesen Komplexen von zwei Sauerstoffatomen vom Nucleophil bzw. von der Abgangsgruppe axial koordiniert. NDP = Nucleotiddiphosphat.

Diese Frage wurde endgültig durch die Kristallstrukturanalyse des Komplexes aus Ras·GDP und GAP-334 in Gegenwart von Aluminiumfluorid beantwortet (Abbildung 4).^[163, 164] Die Struktur lässt erkennen, dass in der Tat eine Argininseitenkette von GAP in das aktive Zentrum von Ras ragt und mit Aluminiumfluorid wechselwirkt, das die zu übertragende Phosphorylgruppe imitiert. Dies wurde dahingehend interpretiert, dass die Phosphoryltransferreaktion assoziativ abläuft und sich negative Ladung im Übergangszustand der GTPase-Reaktion anreichert. Diese Ladung wird von der Guanidiniumseite von Arg 789 kompensiert, wodurch der Übergangszustand der Reaktion stabilisiert wird. Dies untermauerte die kinetischen Daten, nach denen der k_{cat} -Wert für p120GAP und Neurofibromin um den Faktor 2000 herabgesetzt wurde, wenn dieser Argininrest mutiert wurde.^[162–165]

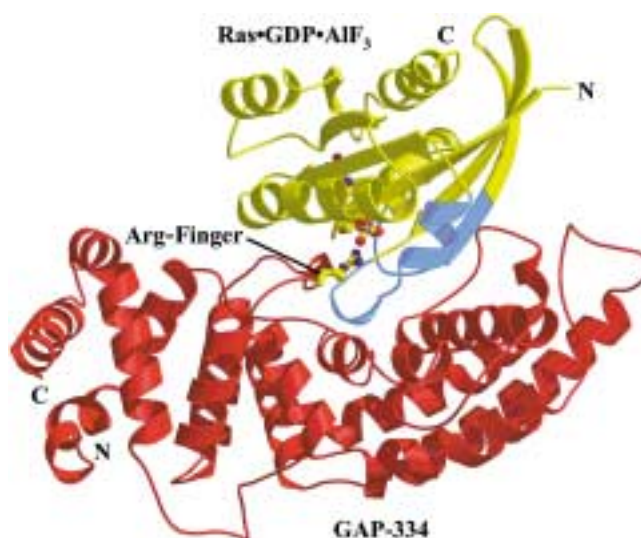


Abbildung 4. Bänderdarstellung des Komplexes aus GAP-334 und Ras·GDP in Gegenwart von Aluminiumfluorid. Die Struktur ist ein Mimetikum des Übergangszustands der GAP-katalysierten Reaktion und weist eine Argininseitenkette (den Arginin-Finger) auf, die mit AlF_3 wechselwirkt, welches das übertragene Phosphat imitiert.

Der Struktur ist weiterhin zu entnehmen, dass Gln61 von Ras den Übergangszustand durch die Bildung einer zweizähligen Wasserstoffbrücke zum Fluorid und zum angreifenden Wasser stabilisiert. Dies erklärt den Befund, dass die Mutation von Gln61, wie sie in vielen Tumoren auftritt, ebenfalls eine für die Katalyse sehr wichtige chemische Gruppe betrifft. So verringert die Mutation zu Alanin die katalytische Effizienz des Ras·RasGAP-Systems um fünf Größenordnungen (Ahmadian et al., unveröffentlichte Ergebnisse). Aus der Struktur konnte darüber hinaus ersehen werden, dass die Mutation von Gly12 zu jeder anderen Aminosäure die GAP-unterstützte GTP-Hydrolyse inhibiert, da diese andere Aminosäure mit vielen anderen Atomen des Übergangszustandanalogs in Konflikt gerät. Da Gly12-Mutanten an GAP binden,^[156, 157, 166, 167] können wir annehmen, dass der Grundzustand des Ras·RasGAP-Komplexes sich vom Komplex des Übergangszustandes unterscheidet. Der Mechanismus der GTPase-Aktivierung durch GAPs wurde strukturell und biochemisch für die Wechselwirkung von GTP-bindenden Proteinen des Rho-Typs und ihren spezifischen RhoGAPs bestätigt.^[168–174] Er könnte daher ein universelles Prinzip für die GTPase-Aktivierung kleiner GTP-bindender Proteine sein.^[175]

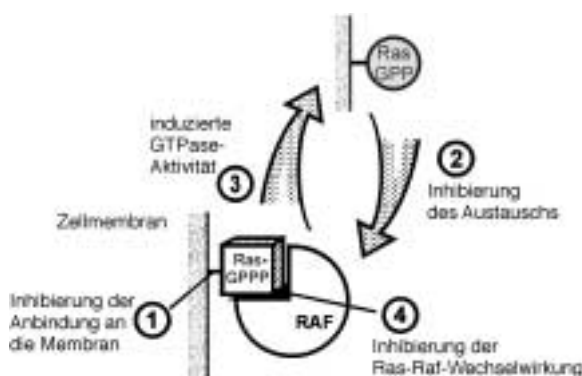
3. Ras als molekulares Ziel für die Entwicklung von Antitumorstoffen

Die entscheidende Rolle der Ras-Proteine bei der Aufrechterhaltung des regulären Lebenszyklus von Zellen und die intensive Beteiligung von mutiertem Ras an der Entwicklung einer Vielzahl von Tumoren haben die Idee aufkommen lassen, durch Beeinflussung der Ras-Funktion neue Möglichkeiten für die Entwicklung alternativer Antitumorstoffe zu erhalten.^[176, 177] Die Unterbrechung des aberranten Wachstumssignals onkogener Ras-Proteine liefert ein Beispiel für

das, was heute „Signaltransduktionstherapie“ genannt wird.^[178]

Mindestens vier Ansätze, die auf die transformierenden Aktivitäten mutierter Ras-Proteine zielen, sind verfolgt worden (Schema 11):

1. Ras-Proteine müssen sich an der Plasmamembran befinden, um ihre biologische Funktion im normalen und im transformierten Zustand der Zelle erfüllen zu können. Kovalent angebundene Lipide sind die treibende Kraft für die Membranlokalisation. Nicht mit Lipiden ausgestattetes Ras ist cytosolisch und biologisch inaktiv. Einige posttranslationale Modifikationen am Carboxyterminus von Ras sind nötig, bevor das ursprünglich biosynthetisierte Vorstufenprotein zu einem biologisch aktiven Protein an der Plasmamembran reift. Ein Eingriff in diese Reifungsprozesse könnte die abberanten Wachstumssignale von onkogenem Ras unterbrechen.
2. Ras-Proteine werden durch den Austausch von GDP gegen GTP aktiviert. Die Verhinderung dieses Austausches wurde von einigen ebenfalls als Möglichkeit betrachtet, die Ras-Aktion zu blockieren.
3. Onkogene Mutanten von Ras enthalten Mutationen, die die Empfindlichkeit gegenüber RasGAPs herabsetzen und damit ein Ausschalten von Ras verhindern. Wirkstoffe, die die intrinsische GTPase-Aktivität von onkogenem Ras stimulieren, würden diese in den inaktiven Zustand zurückversetzen und das Wachstumssignal stoppen.
4. Sobald es aktiviert wird, leitet Ras den Stimulus durch die Aktivierung weiterer Proteine wie Raf, RafGEF und PI(3)-Kinase weiter. Aktiviertes Ras sollte also mit Antagonisten für seine Wechselwirkung mit Downstream-Effektoren daran gehindert werden können, sein Signal weiterzuleiten.

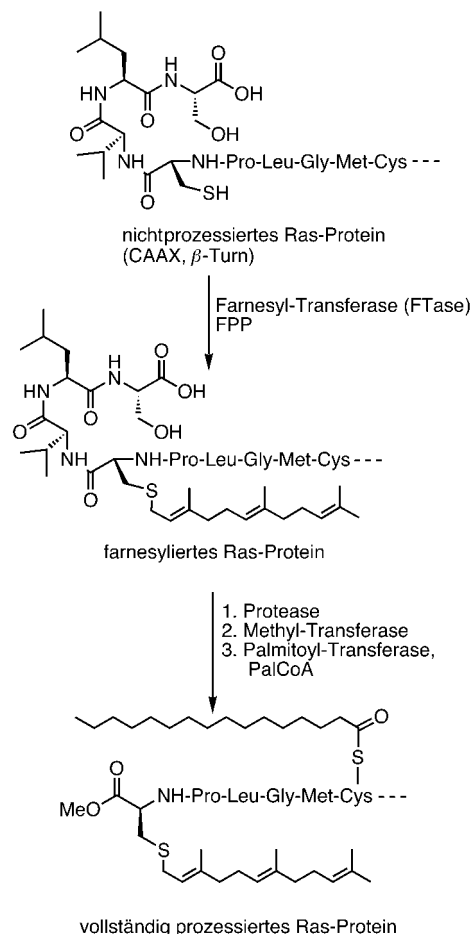


Schema 11. Übersicht über die möglichen Ansätze zur Entwicklung von Anti-Ras-Wirkstoffen für den Einsatz in der Antitumorthherapie (Einzelheiten siehe Text).

3.1. Inhibierung der posttranslationalen Modifikation von Ras-Proteinen

Ras-Proteine werden als biologisch inaktive cytosolische Vorstufenproteine synthetisiert, anschließend durch verschiedene posttranslationale Prozessierungsschritte am Carboxyterminus modifiziert und so in biologisch aktive Proteine umgewandelt, die an der Plasmamembran lokalisiert sind.

Der Cysteinrest der C-terminalen CAAX-Sequenz (C steht für Cystein, A ist im Allgemeinen eine aliphatische Aminosäure und X ein Methionin-, Serin-, Alanin- oder Glutaminrest) wird zunächst enzymatisch S-farnesyliert, der AAX-Teil wird dann durch eine spezifische Protease abgespalten. Das freie C-terminale Cystein wird schließlich in einen Methyl-ester umgewandelt (Schema 12). Bei H- und N-Ras erhalten zusätzliche Cysteinreste in der unmittelbaren Nachbarschaft



Schema 12. Posttranslationale Modifikation von Ras-Proteinen mit Lipidgruppen (FPP = Farnesylpyrophosphat, PalCoA = Palmitoyl-CoA).

der CAAX-Sequenz durch die Bildung von Palmitinsäurethioestern eine Lipidmodifikation. Die Verankerung von Ras-Proteinen an der Plasmamembran wird durch diese Lipidgruppen vermittelt. Genetische Experimente ergaben, dass die Farnesylierung essentiell für die Funktion von Ras im normalen und im transformierten Zustand der Zelle ist.^[40] Die Palmitoylierung scheint für die zelltransformierende Aktivität von Ras nicht absolut notwendig zu sein, ist aber für die volle biologische Aktivität wichtig.^[179] Das K-Ras4B-Protein kompensiert das Fehlen des hydrophoben Palmitoylrestes durch eine positiv geladene Lysin-reiche Region in der Nähe der CAAX-Box, die die Wechselwirkungen mit negativ geladenen Phospholipiden in der Zellmembran verstärkt.

Die Entdeckung, dass Lipidmodifikationen an Ras, insbesondere die Farnesylierung, wesentlich für dessen biologische Aktivität sind, führte zu der Idee, dass für die Modifikation

verantwortliche Enzym zu inhibieren, um so die Funktion von Ras zu blockieren. Diese Idee lieferte neue Ansätze für die Entwicklung wirksamer Antitumorwirkstoffe.

3.1.1. Inhibierung der Ras-Farnesyl-Transferase (FTase)

Bei der FTase handelt es sich um ein heterodimeres Protein, das aus einer α - und einer β -Untereinheit besteht. Für seine Aktivität benötigt es Zink- und Magnesium-Ionen.^[180, 181] Ein eng verwandtes heterodimeres Enzym ist die Geranyl-Geranyl-Transferase I (GGTase I). Es erkennt ebenfalls Proteine mit CAAX-Box, wenn X ein Leucinrest ist. Beide Enzyme enthalten die gleiche α -Untereinheit und benötigen Zn^{2+} und Mg^{2+} . Ihre β -Untereinheiten sind jedoch verschieden. Die Ähnlichkeit beider Enzyme unterstreicht, wie wichtig die Selektivität von FTase-Inhibitoren ist.

Seit der Entdeckung der Ras-Farnesylierung ist eine Vielzahl von FTase-Inhibitoren entwickelt worden. Dieses Gebiet wurde bereits in detaillierten Übersichtsartikeln zusammengefasst,^[38, 176, 177, 182–184] daher wird hier nur ein kurzer Überblick gegeben. Anfängliche Versuche zur Inhibitorentwicklung basierten auf Informationen über die Substratspezifität genauso wie auf strukturellen (NMR-) Untersuchungen des Substrats in Lösung und an das Enzym gebunden, wobei der gebundene Ligand Cys-Val-Trp-Met einen β -Loop des Typs III bildet (Schema 12). Wie die mit einer Auflösung von 2.25 Å erhaltene Kristallstruktur des freien Enzyms^[185] zeigt, besteht das aktive Zentrum aus zwei Spalten, die sich an der Position des gebundenen Zink-Ions schneiden. Das Zink-Ion koordiniert die Thiolgruppe eines Cysteinrestes in einem ternären Komplex. Eine der beiden Spalten ist eine hydrophile Oberflächenfurchung in der Nähe der Wechselwirkungsfläche der Untereinheiten. Sie könnte der Bindungsstelle für Ras entsprechen. Die zweite Spalte stellt eine Region mit aromatischen Aminosäureseitenketten dar. Ihre Größe reicht aus, den Farnesylrest – aber nicht das längere Geranylgeranylpyrophosphat – aufzunehmen. Zusätzlich wurde die Struktur des Rattenenzym im Komplex mit Farnesylpyrophosphat mit einer Auflösung von 3.41 Å gelöst.^[186] Die dreidimensionale Information aus den Kristallstrukturen sollte nun die Entwicklung von spezifischeren Inhibitoren erlauben.

3.1.2. CAAX-Motiv-Inhibitoren

Auf der Grundlage des CAAX-Motivs wurden Peptide entwickelt, in denen die Amidbindungen durch Amin- und Ethergruppen ersetzt wurden.^[187] Insbesondere das β -Turn-Mimetikum **1** (Schema 13) inhibiert die FTase in vitro mit einem IC_{50} -Wert von 1.8 nM und zeigt eine hohe spezifische Aktivität im Vergleich zur Inhibierung von GGTase I. Der weniger polare Methylester **2** zeigte als Wirkstoffvorstufe in vivo bessere Resultate und inhibierte die Farnesylierung von Ras und das Wachstum von Ras-transformierten Zellen, während Raf- oder Mos-transformierte Zellen nicht beeinflusst wurden. Das Wachstum menschlicher Pankreas-Adenokarzinomzellen mit mutierten *K-Ras*-, *c-Myc*- und *p53*-Genen wurde durch die Gabe von **2** ebenfalls inhibiert. Wenn der Wirkstoff über einen Zeitraum von fünf Tagen an Mäusen

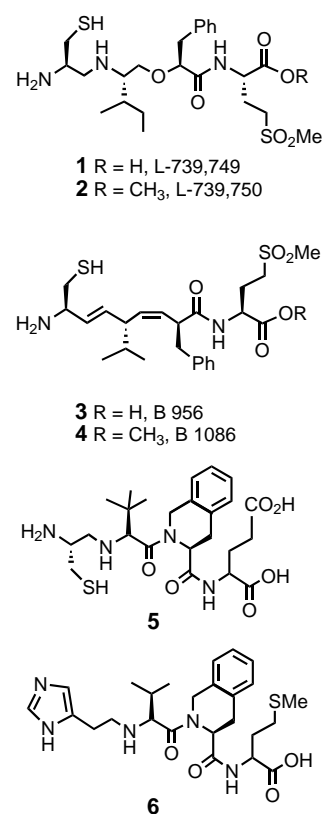
mit implantierten Ras-abhängigen Tumoren verabreicht wird, kann das Tumorstadium bis zu 66% im Vergleich zu unbehandelten Mäusen verringert werden, wohingegen die Anwendung des Antitumor-Antibiotikums Doxorubicin unter den gleichen Bedingungen zu einer Verminderung um lediglich 33% führte. Es ist insbesondere bemerkenswert, dass die Behandlung mit dem β -Turn-Mimetikum – im Vergleich zu der mit Doxorubicin – ohne sichtbare Nebenwirkungen, wie z. B. Gewichtsverlust, blieb.

Jedoch beeinflusst **2** auch die Regulation der Bildung von Aktin-Stressfasern.^[188] Rho-Proteine sind an der Regulation verschiedener Cytoskelettstrukturen beteiligt. Von RhoB wird angenommen, eines der primären Ziele der FTase-Inhibitoren zu sein. RhoB wird offensichtlich sowohl geranylgeranyliert als auch farnesyliert.^[189, 190] Wenn Zellen mit **2** behandelt werden, wird die vesikuläre Lokalisation von RhoB verhindert. Daher könnte **2** auch die Farnesylierung von RhoB inhibieren und damit auch in die Bildung von Aktin-Stressfasern eingreifen.^[191]

Weitere Modifikationen der CAAX-Tetrapeptidstruktur führten zum Inhibitor **3**, der die Farnesylierung von H-Ras mit $\text{IC}_{50} = 11$ nM hemmt.^[192] Tumorzelllinien, die mutiertes H-Ras und N-Ras exprimieren, waren sehr empfindlich gegenüber diesem Wirkstoff, der das Wachstum von humanen EJ-1-Blasenkarzinomen bei einer Dosis von 100 mg kg^{-1} um ca. 60% vermindert. Die In-vivo-Ergebnisse und die durch die hier beschriebenen CAAX-Mimetika induzierte, spezifische Tumorrogression zeigen deutlich die Effizienz von FTase-Inhibitoren als Antitumorwirkstoffe.

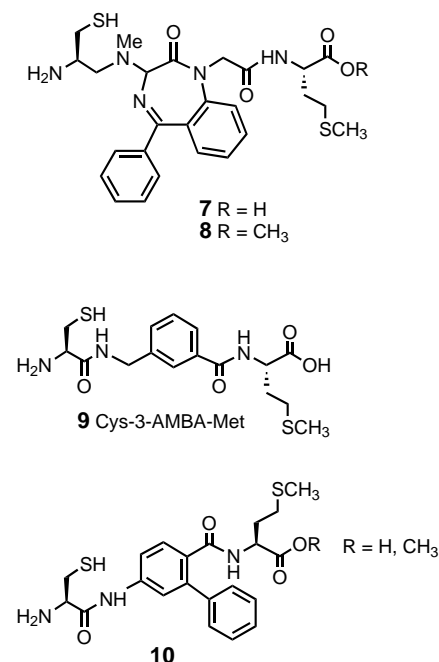
Hohe Aktivität und Selektivität konnte ebenfalls nach Ersetzen der Phenylalaninseitenkette in Cys-Val-Phe-Met durch 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-3-carboxylat (Tic) und Modifizierung des Peptidrückgrats wie bei **5** erreicht werden (Schema 13).^[193] Dieser Wirkstoff weist gegenüber Ratten-FTase einen IC_{50} -Wert von 2.8 nM und eine 500fache Selektivität gegenüber GGTase I auf. Bei dem Wirkstoff **6** wurde die terminale Cysteinseitenkette durch 4-Imidazol ersetzt. Dies führte zu einer Zunahme an Aktivität ($\text{IC}_{50} = 0.79$ nM).^[194]

Die beiden aliphatischen Aminosäuren im CAAX-Motiv wurden durch Benzodiazepine wie in **7** und **8** ersetzt



Schema 13. FTase-Inhibitoren, in denen Amidgruppen durch isosterische Amin- und Ethergruppen ersetzt wurden, sowie solche, die nicht-natürliche Aminosäuren enthalten.

(Schema 14). Die zentrale Einheit dieser Peptidomimetika imitiert einen β -Turn und führt den NH_2 -Terminus des Cysteinanaloges und den COOH -Terminus des Methioninrestes in räumliche Nähe, sodass diese dann das für die Aktivität der FTase essentielle Zn^{2+} -Ion komplexieren können.^[195] Die freie Säure **7** inhibiert das Enzym mit einem IC_{50} -Wert von



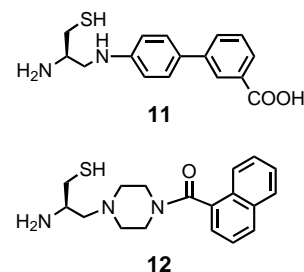
Schema 14. FTase-Inhibitoren, in denen das AA-Dipeptid ersetzt wurde.

1 nm in intakten Zellen. Der Methylester **8** ist jedoch trotz seiner niedrigeren In-vitro-Aktivität signifikant leistungsfähiger, da er die Plasmamembran aufgrund seiner geringeren Polarität besser durchdringen kann. Diese Eigenschaft kann genutzt werden, um die Morphologie von H-Ras-transformierten Zellen wieder in den Normalzustand zu versetzen und das Wachstum dieser Zellen zu verhindern. In Src-transformierten und nichttransformierten Rattenfibroblasten hingegen zeigt die Substanz keinen Effekt. Der Inhibitor wirkt daher selektiv in Ras-transformierten Zellen und beeinflusst das Wachstum normaler Zellen nicht. Dies ist ein bemerkenswertes Ergebnis, da die Farnesylierung des Wildtyp-H-Ras-Proteins durch das Benzodiazepin inhibiert wird und H-Ras am Wachstum normaler Fibroblasten beteiligt ist. Detailliertere Untersuchungen dieses unerwarteten Ergebnisses ergaben, dass der Inhibitor **8** die Menge farnesylierten H-Ras-Proteins in nichttransformierten und in H-Ras-transformierten Zellen herabsetzt. Allerdings führt dies nur in den transformierten Zellen zur erwarteten Verringerung der enzymatischen Aktivität in der Ras-Kaskade: Sowohl die Menge an phosphoryliertem Raf als auch die Aktivitäten von MEK-1-, MEK-2- und MAP-Kinase sind in den Tumorzellen herabgesetzt.^[196] Hinzu kommt, dass die Stimulierung des Ras-Signaltransduktionsweges weder in normalen noch in den Src-transformierten Zellen von EGF beeinflusst wird. Normale Zellen können den Signalweg unabhängig von Ras-inhibierenden Wirkstoffen aktivieren.

Tatsächlich ergaben weitere Experimente, dass die Farnesylierung von K-Ras durch die Inhibitoren beträchtlich weniger beeinflusst wird als die von H-Ras. K-Ras ist auch ein Substrat der GGTase I und kann deshalb geranylgeranyliert werden, wenn die Aktivität der FTase herabgesetzt ist. Normale und Src-transformierte Zellen können somit offensichtlich im Unterschied zu H-Ras-transformierten Zellen den Verlust eines Ras-Proteins oder eines für das normale Zellwachstum wichtigen Enzyms durch die Aktivierung alternativer Wege kompensieren.

Die beiden aliphatischen Aminosäuren wurden ebenfalls durch die hydrophoben Spacer 3-(Aminomethyl)benzoesäure (3-AMBA) **9** (Schema 14)^[197] und 3- und 4-Aminobenzoessäure (3- und 4-ABA) sowie durch 2-Phenylaminobenzoessäure **10**^[198, 199] ersetzt. Diese Stoffe wiesen IC_{50} -Werte im nanomolaren Bereich auf und **10** (R = H) blockierte in Nacktmäusen das Wachstum eines menschlichen Lungenkarzinoms, das onkogenes Ras exprimiert.^[200]

In weiteren Untersuchungen wurde nicht nur das zentrale AA-Dipeptid, sondern das AAX-Tripeptid ersetzt, was zur Entwicklung des Biphenyl-Derivats **11**^[201] und des Piperazin-Analogons **12**^[202] führte (Schema 15). Deren IC_{50} -Werte liegen im nanomolaren Bereich, während die Geranylgeranyl-Transferase mit IC_{50} -Werten im Mikromolbereich blockiert wird. Beide Stoffe unterbrechen die Prozessierung von Ras in Zellen, das Piperazin-Derivat **12** unterdrückt das Tumorstadium bei einer Dosis von 40 mg kg^{-1} um 75 %.

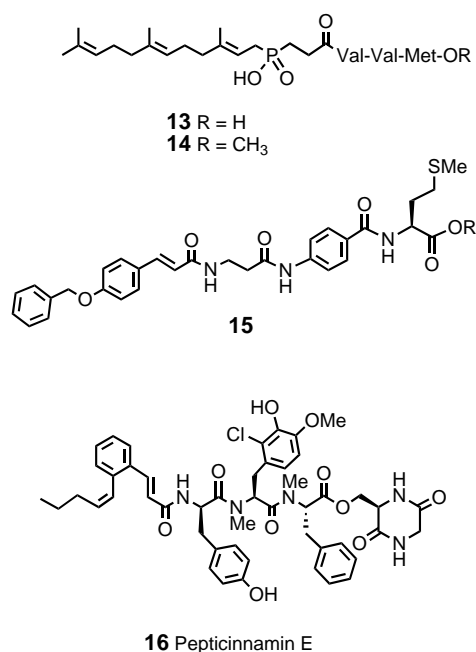


Schema 15. FTase-Inhibitoren, in denen das AAX-Tripeptid ersetzt wurde.

3.1.3. Bisubstrat-Inhibitoren

Weniger intensiv wurden Ansätze verfolgt, FTase-Inhibitoren zu entwerfen, die auf der Struktur von Farnesylpyrophosphat basieren, da es möglicherweise nichtselektive Effekte mit anderen Enzymen wie z.B. Squalensynthetase geben könnte, die Farnesylpyrophosphat ebenfalls als Substrat akzeptiert.^[38, 176, 177, 182–184]

Dennoch sind Bisubstrat-Inhibitoren, die ein Farnesyl- und ein CAAX-Analog vereinen, viel versprechend, da man von ihnen erhöhte Aktivität und Selektivität erwarten kann. Die Phosphinsäuren **13** (R = H) und **14** (R = Me; Schema 16) sind Beispiele für Bisubstrat-Analoga. Tatsächlich ist **13** ein effektiver In-vitro-Inhibitor und die Wirkstoffvorstufe **14** zeigt Aktivität in H-Ras- und in geringerem Maße auch K-Ras-transformierten Zellen.^[203] Verbindung **14** inhibiert auch das Wachstum maligner Zellen der Neurofibromatose Typ I, die vermutlich überaktives Wildtyp-Ras enthalten, da ihnen aktives Neurofibromin-GAP fehlt.^[204] Diese sehr viel versprechenden Ergebnisse werden durch die geringere Bioverfügbarkeit und In-vivo-Aktivität im Vergleich zu denen der Peptidomimetika gedämpft. Kürzlich wurde beschrieben, dass Benzyloxycinnamoylamid **15** und zwei seiner Analoga Bisubstrat-Inhibitoren der Hefe-FTase sind,^[205] wobei die



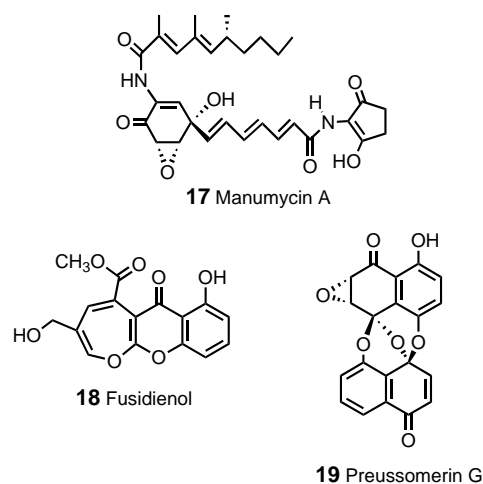
Schema 16. Bisubstrat-Inhibitoren von FTase.

Benzyloxycinnamoylgruppe den Farnesylteil imitiert. Diese Stoffe weisen IC₅₀-Werte im unteren mikromolaren Bereich auf.

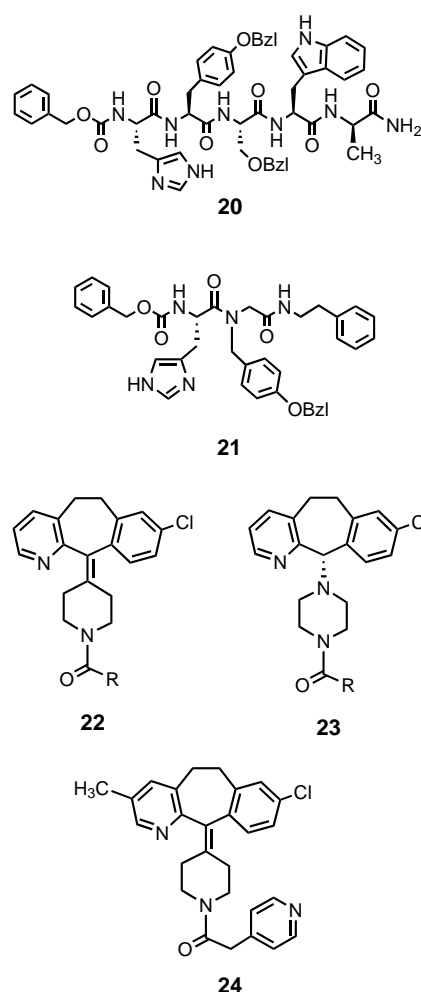
Der Naturstoff Peptidinnamin E **16** wird ebenfalls als Bisubstrat-Inhibitor in Erwägung gezogen. Mit der erfolgreichen Synthese von Peptidinnamin E wurde der Zugang zu Analoga dieses Peptidwirkstoffs eröffnet und die Bestimmung von Strukturparametern, die für die FTase-inhibierende Aktivität wichtiger sind, rückte ein Stück näher. Erste Untersuchungen ergaben, dass das zentrale Tripeptid zum Teil und insbesondere die absolute Konfiguration der zentralen chlorierten Aminosäure entscheidend für die Inhibitorwirkung sind.^[206] Die bislang entwickelten Bisubstrat-Inhibitoren haben genauso wie einige der CAAX-Analoga (siehe Abschnitt 3.1.2) den Vorteil, keine freien Cystein-SH-Gruppen zu enthalten und daher stabiler zu sein.

3.1.4. Farnesyl-Transferase-Inhibitoren aus natürlichen Quellen und Substanzbibliotheken

Zusätzlich zu Peptidinnamin E wurden weitere Naturstoffe als FTase-Inhibitoren identifiziert, wie z.B. Manumycin **17** und Analoga,^[207] Fusidienol **18**^[208] und die Preussomerine, z.B. **19**^[209] (Schema 17; für weitere Beispiele siehe Lit. [182]). Im Allgemeinen erwiesen sich diese Substanzen als weniger wirksam im Vergleich mit Analoga, die auf CAAX basieren und die typischerweise IC₅₀-Werte im unteren mikromolaren oder höheren nanomolaren Bereich aufweisen. Auch durch das High-Throughput-Screening von Substanzbibliotheken wurden weitere Inhibitoren der Farnesyl-Transferase identifiziert: beispielsweise das hochwirksame Pentapeptid **20** (Schema 18), das die FTase mit IC₅₀ = 17 nM inhibiert und als Ras-Antagonist in *Xenopus*-Oocyten wirkt.^[210] Systematische Derivatisierung und Verkürzung des Peptidrückgrats führten letztlich zum Dipeptid **21**, dass die Ras-Pro-



Schema 17. FTase-Inhibitoren natürlichen Ursprungs.



Schema 18. FTase-Inhibitoren aus Substanzbibliotheken.

zessierung in Zellen inhibierte und die Lebensspanne von tumortragenden Nacktmäusen bei einer Dosis von 200 mg kg⁻¹ um 35 % verlängerte.^[182, 211]

Insbesondere wurde eine Reihe von Nichtpeptid- und Nichtsulfhydryl-FTase-Inhibitoren gefunden, so z.B. die Verbindungen **22–24** (Schema 18). Diese Chlorbenzocyclo-

heptapyridine weisen eine ausgeprägte Selektivität für FTase im Vergleich zu der für GGTase I auf. Sie verfügen sowohl über verbesserte In-vivo-Antitumoraktivitäten als auch über bessere pharmakokinetische Profile bei oraler Verabreichung an Mäuse und verhindern darüber hinaus die Ras-Prozessierung in Cos-Affennierzellen.^[212, 213] Umfangreiche Variationen der Substituenten am Piperidinteil und am tricyclischen Ringsystem führten zur Entwicklung von **23**, das die FTase mit $IC_{50} = 40$ nM inhibiert und inaktiv gegenüber GGTase I ist.

3.1.5. Fehlende Toxizität für normale Zellen

Obwohl FTase-Inhibitoren die Farnesylierung von Ras beeinflussen, ist es wahrscheinlich, dass sie auch die post-translationalen Modifizierungen anderer CAAX-Proteine behindern. Abgesehen von den ca. 20 heute bekannten farnesylierten Proteinen ist die Farnesylierung ebenso für die normale Funktion von Ras notwendig und damit für die normale Lebensfähigkeit der Zelle wichtig. Aus diesen Gründen wurden FTase-Inhibitoren als potentiell toxisch eingeschätzt. Jedoch erwiesen sich die Wirkstoffe als überraschend ungiftig und wiesen keine Inhibitoraktivität in Nager-Fibroblastenzellen auf.^[214] In Zellkulturen hemmten FTase-Inhibitoren nicht nur das Wachstum von transformierten Zellen weit stärker als das von normalen, sondern riefen auch erstaunlich wenig Nebenwirkungen bei der Behandlung von tumortragenden Tieren hervor, ohne in normalem Gewebe bei Behandlungsdauern von bis zu sechs Wochen eine merkliche Toxizität aufzuweisen.

Es gibt mehrere mögliche Erklärungen für dieses Fehlen von Toxizität. Einige geranylgeranylierte Ras-ähnliche Proteine könnten den Verlust an Ras-Funktion kompensieren.^[215] Alternativ könnte die Inhibierung der Farnesyl-Transferase die Ras-Aktivität unter den für die Transformation benötigten Grad herabsetzen, aber dennoch ausreichend Ras-Aktivität zulassen, um die normale Lebensfähigkeit der Zellen aufrechtzuerhalten.^[216] Gleichfalls könnte ein alternativer Signalweg aktiviert werden, wenn Ras nicht an der Plasmamembran verankert ist. Toxizitäts- und Effizienztests sind häufig in H-Ras enthaltenden Fibroblastenzellen aus Nagern durchgeführt worden. Die FTase-Inhibitoren blockieren jedoch die Prenylierung von K-Ras4B und N-Ras nicht so effektiv wie die von H-Ras (siehe Abschnitt 3.1.6).^[217] Normale Zellen könnten daher weniger empfindlich gegenüber diesen Wirkstoffen sein, da sie K-Ras4B und N-Ras exprimieren. In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass Mutationen von H-Ras in menschlichen Tumoren sehr ungewöhnlich sind.^[218] Das *K-Ras*-Gen ist das am häufigsten mutierte in soliden menschlichen Tumoren, das *N-Ras*-Gen herrscht bei Leukämien vor. Daher muss die vorklinische Bewertung der Farnesylierungsinhibitoren vor Versuchen am Menschen nochmals kritisch hinterfragt werden.

3.1.6. Wirkungsmechanismus

Die intensive Erforschung einer Vielzahl von FTase-Inhibitoren hat klar erbracht, dass diese Wirkstoffe in Zellkulturen antiproliferative Aktivität gegenüber einer Viel-

zahl von transformierten Zelllinien und Tumoren in Tieren haben. Insbesondere Zellen mit mutiertem H-Ras-Protein sind gegenüber diesen Substanzen empfindlich. Zwar wird auch das Wachstum von K-Ras4B-transformierten Zellen blockiert, doch werden hierfür wesentlich höhere Konzentrationen benötigt, da dieses Protein ein wesentlich besseres Substrat für die FTase ist als H-Ras.^[219] Darüber hinaus kann das K-Ras4B-Protein wesentlich einfacher von der GGTase geranylgeranyliert werden und damit die fehlende Farnesylierung kompensieren.^[220, 221] Da geranylgeranylierte Formen von Ras-Proteinen Zellen ebenfalls stark transformieren können, wird von FTase-Inhibitoren nicht erwartet, dass sie das Wachstum von Tumoren mit mutiertem K-Ras4B behindern. Dennoch wird trotz der alternativen Prenylierung eine Wachstumshemmung beobachtet. Offensichtlich trägt die Blockierung der Farnesylierung eines oder mehrerer nicht mit Ras identischer Proteine zum beobachteten Effekt bei oder ist sogar allein für ihn verantwortlich. Dies wird durch den Befund unterstützt, dass das Wachstum von Fibroblastenzellen, die von N-terminal myristoyliertem (und deshalb membranverankertem) Ras – das also nicht farnesyliert oder geranylgeranyliert werden kann – transformiert wurden, durch FTase-Inhibitoren ebenso inhibiert wird.^[222]

Diese Ergebnisse haben die Frage aufgeworfen, welche anderen Proteine molekulare Ziele (Targets) der FTase-Inhibitoren sind. Eine Klasse von Kandidaten bilden Mitglieder der Rho-Proteinfamilie, wie insbesondere RhoB. RhoB ist ein ausgesprochen attraktives Target, da Rho-Proteine für die Transformation durch Ras benötigt werden und weil RhoB ein durch Wachstumsfaktorsignale aktiviertes Protein ist, das unmittelbar nach Eingang des Signals exprimiert wird (immediate early gene response protein). RhoB ist eines der Targets von FTase-Inhibitoren (siehe Abschnitt 3.1.2 und Lit. [223]). Ein weiteres neu entdeckte Ras-ähnliches farnesyliertes Protein, Rheb, könnte ebenfalls ein Target sein. Rheb moduliert die Ras-Funktion und ist ein Antagonist der Transformation durch Ras. Seine Prozessierung und Membranlokalisierung kann durch einen FTase-Inhibitor gehemmt werden.^[224]

Viele der biologischen Studien mit FTase-Inhibitoren legen nahe, dass es sich hierbei eher um cytostatisch wirkende Agentien handelt, die das Zellwachstum unterdrücken, als um cytotoxische. Allerdings wurde auch festgestellt, dass die Inhibierung der Farnesyl-Transferase in einem Mäusetumormodell zu Tumorregression von Brust- und Speicheldrüsenkarzinomen führt.^[214] Der Mechanismus der Tumorverkleinerung war unklar, aber wie eine aktuelle Studie ergab, kann ein FTase-Inhibitor die Apoptose (Selbstmord der Zelle) in Zellkulturen unabhängig vom Tumorsuppressor-Protein p53 (einem Vermittler der Apoptose) auslösen.^[225] Diese Befunde können von Relevanz für die klinische Anwendung sein, da die Resistenz gegen übliche Krebstherapeutika häufig durch Änderungen an p53 vermittelt wird. Daher könnten FTase-Inhibitoren noch wirksam gegen Tumore sein, die mutiertes p53 enthalten.

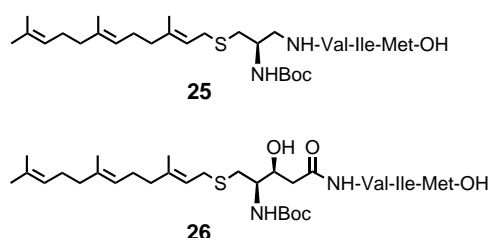
Viele der Fragen, die die biologische Aktivität von FTase-Inhibitoren betreffen, sind bereits angegangen worden, dennoch bleiben zahlreiche Fragen noch zu beantworten. Insbesondere die Folgen ihrer Umgehung durch die Geranylge-

ranylierung von K-Ras4B und die Unsicherheit über die zellulären Targets dieser Wirkstoffe erfordern intensive Forschungsarbeiten. Nichtsdestoweniger ist es klar und allgemein akzeptiert, dass FTase-Inhibitoren sehr effektiv sind und signifikante Antitumoraktivität gegen Ras-abhängige Tumore aufweisen. Gleichzeitig sind sie in vielen tierischen Tumormodellen nicht oder nur wenig toxisch. Sie haben nun das Stadium klinischer Untersuchungen am Menschen erreicht.^[211, 226] Die klinischen Versuche werden die Antwort auf die Fragen nach Wirksamkeit, Toxizität, Entwicklung von Resistenzen und dem Wirkungsmechanismus dieser Substanzen liefern, sodass ihr volles therapeutisches Potential gewürdigt werden kann.

3.2. Carboxyterminale Protease, Methyl-Transferase und Palmitoyl-Transferase/Esterase als Ziele

Zusätzlich zur Farnesylierung ist die vollständige Prozessierung von Ras notwendig, um die volle biologische Aktivität des Proteins zu erhalten. So können auch die Protease, die Methyl-Transferase und das Protein, das den Palmitinsäurethioester einführt, Ziele für neue Anti-Ras-Wirkstoffe sein. Die Endoprotease kann durch Analoga des C-terminalen CAAX-Tetrapeptids inhibiert werden, in denen die Cysteinamidgruppe zu einem Methylenamin oder einem Hydroxymethylenamin reduziert ist.^[227, 228]

Die Verbindungen **25** und **26** (Schema 19) weisen K_i -Werte im Bereich von 60–80 nM auf. Diese Inhibitoren können als Ausgangspunkte für das Design neuer Wirkstoffkandidaten dienen. Diese Möglichkeit wird durch die Isolierung und



Schema 19. Inhibitoren von carboxyterminaler Protease. Boc = *tert*-Butoxycarbonyl.

Klonierung des Rce1-Proteins aus *Saccharomyces cerevisiae* als der CAAX-Protease gestützt.^[229] Sie ist an der Membran lokalisiert und ihre Deletion führt zu Defekten bei der Lokalisierung von Ras. Die Methyl-Transferase, die Ras methyliert, wurde in verschiedenen Säugetiergeweben identifiziert und kann durch einfache Farnesylcysteinanaloga wie Farnesylthioessigsäure inhibiert werden.^[230] Allerdings wurde die Verwendung von Methyl-Transferase-Inhibitoren nicht im Hinblick auf ihre Eigenschaften untersucht, die Ras-Funktion zu behindern.

Die mögliche Beteiligung einer mutmaßlichen Palmitoyl-Transferase bei der abschließenden Prozessierung von H- und N-Ras hat beträchtliches Interesse^[231] auf sich gezogen, da diese Ras-Isoformen ihre volle biologische Funktion nur ausüben, wenn sie palmitoyliert sind. Tatsächlich wurde eine

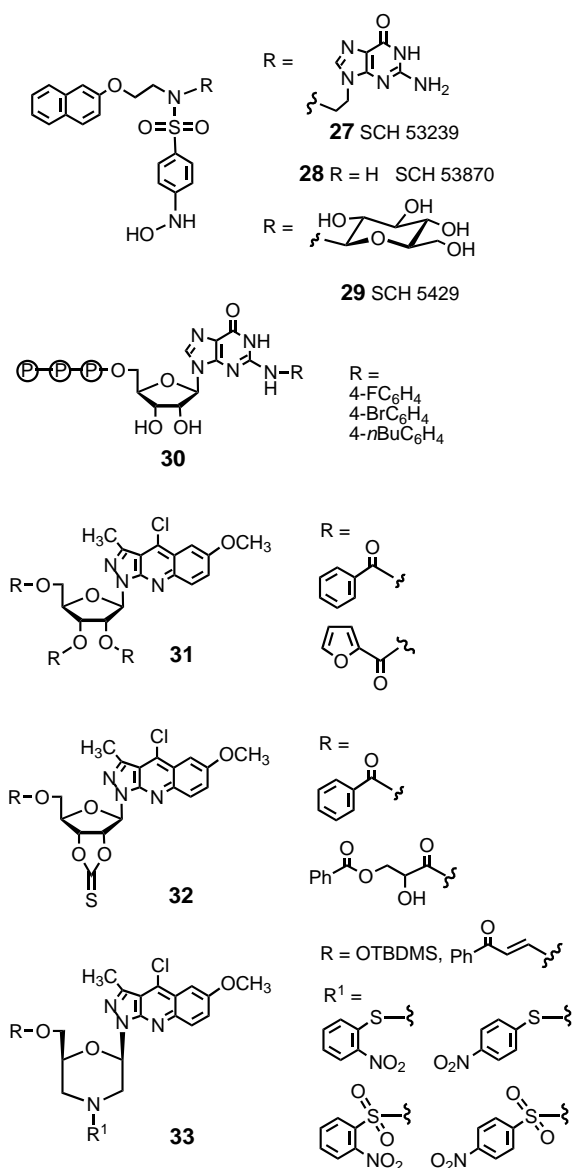
enzymatische Aktivität beschrieben, die Ras palmitoyliert,^[232] diese stellte sich aber später als Thiolase heraus. Bis heute konnte die Transferase, nach der schon lange gesucht wurde, nicht isoliert werden. Allerdings wurde eine Proteinpalmitoyl-Thioesterase identifiziert, die Ras prozessiert.^[233] Das Enzym wurde als „the first bona fide player“ bei der Palmitoylierung von Ras beschrieben. Die Inhibierung seiner Funktion könnte neue Alternativen für die Regulation der Plasmamembranlokalisierung und damit der biologischen Aktivität von H- und N-Ras eröffnen.

3.3. Inhibierung des Nucleotidaustausches

Es ist nicht gerade plausibel, nach Inhibitoren der GDP-GTP-Austauschreaktion zu suchen, kommen doch onkogene Versionen von Ras in der Zelle zumeist im GTP-gebundenen Zustand vor.^[146] Nichtsdestoweniger sind Versuche unternommen worden, solche Substanzen zu identifizieren. Sie könnten möglicherweise in Fällen hilfreich sein, in denen eher Upstream-Bestandteile des Ras-Signalweges aktiviert sind als Ras selbst. Basierend auf Molecular-Modeling-Rechnungen wurden die Substanzen SCH 53239 **27**, SCH 53870 **28** und SCH 54292 **29** (Schema 20) entworfen, die mit GDP um die Nucleotidbindungsstelle konkurrieren sollten.^[234] Tatsächlich inhibieren diese Substanzen den Nucleotidaustausch von Ras mit IC_{50} -Werten von 0.5–0.7 μ M, aber sie konkurrieren nicht mit der Bindung von GDP. NMR-Analysen von an Ras gebundenen SCH 54292 ergaben, dass es an die Switch-II-Region von Ras bindet und nicht in der Nucleotidbindungs-tasche. Die Switch-II-Region (Aminosäurereste 60–70) ist an der Wechselwirkung von Ras mit Nucleotidaustauschfaktoren beteiligt. Nach Inkubation von NGF-stimulierten (NGF = Nerve Growth Factor) PC-12-Zellen mit SCH 53870 war die Signaltransduktion über Ras blockiert. Das Glycosid SCH 54292 zeigte diesen Effekt nicht, möglicherweise aufgrund verminderter Membranpermeabilität.

Verschiedene Nucleosidtriphosphate und Nucleosidanaloga wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit untersucht, die Bindung von GDP-Bindung an Ras-Proteine zu behindern. Einige GTP-Analoga mit modifiziertem Riboseteil wiesen drastisch verminderte Bindungsaffinitäten zu normalem und mutiertem Ras auf.^[235] Auch die Methylierung von N-7 oder das Ersetzen von N-7 durch eine CH-Gruppe führten nicht zum gewünschten Ergebnis. Demgegenüber wiesen die N-2-substituierten GTPs **30** (Schema 20) höhere Affinitäten als GDP auf, und das 4-(*N*-Butyl)phenyl-Derivat band an die onkogene Mutante doppelt so fest wie an das zelluläre Protein. Die Pyrazolo[3,4-*b*]chinolinriboside **31** und **32** und die Morpholin-Analoga **33** erwiesen sich als moderate In-vitro-Inhibitoren des Nucleotidaustausches an onkogenem Ras.^[236] Überraschenderweise waren die effektivsten Ribosen die vollständig geschützten Triester **31** und die Thionocarbonate **32** (IC_{50} -Werte im unteren μ M-Bereich). Etwas bessere Eigenschaften wiesen Morpholine **33** auf.

Diese ersten Beispiele demonstrieren, dass man im Prinzip den Austausch von GDP zu GTP an Ras inhibieren und damit dessen Aktivierung verhindern kann. Jedoch scheint es sinnvoller zu sein, nichtkompetitive Inhibitoren des GEF-



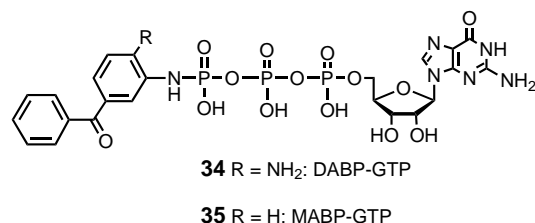
Schema 20. Inhibitoren des GDP-GTP-Austauschs von Ras. TBDMS = *tert*-Butyldimethylsilyl.

katalysierten Nucleotidaustausches zu entwickeln, deren Wirkungsweise der von Brefeldin A ähnelt, als zu versuchen, den Nucleotidaustausch selbst oder die Ras-GEF-Wechselwirkung zu inhibieren. Brefeldin A stabilisiert den zwischenzeitlich entstehenden ArfGDP-Sec7-Domänenkomplex.^[237, 238] Ein ähnlicher nichtkompetitiver Ansatz für den Ras·GEF-Komplex würde die Wechselwirkung mit Effektoren inhibieren, die mit dem Austauschfaktor eine überlappende Wechselwirkungsfläche bilden.

3.4. Die GTPase-Funktion von Ras als Ziel

Das Hauptproblem von onkogenem Ras ist seine Unfähigkeit, GTP zu hydrolysieren. Daher wurde die Stimulierung von onkogenem Ras stets als ein lohnendes Ziel für die Entwicklung von Anti-Ras-Wirkstoffen betrachtet. Mit der Entdeckung, dass die (augenscheinlich einfache) Einführung

eines Argininrestes in das aktive Zentrum von Ras die GTPase sehr effizient stimuliert, ist man diesem Ziel ein gutes Stück näher gerückt, obwohl GAP selbst nicht im Stande ist, die GTP-Hydrolyse von onkogenem Ras zu beschleunigen. Das Konzept einer die GTPase beschleunigenden Substanz bekam weitere Unterstützung durch mit dem GTP-Analogon DABP-GTP **34** (Schema 21) erhaltene Daten.^[239, 240] Normalerweise blockiert die Substitution der β -Phosphatgruppe



Schema 21. DABP-GTP und MABP-GTP – GTP-Analoga, die von onkogenem Ras hydrolysiert werden.

durch einen beliebigen Ester oder ein Amid die Hydrolyse dieser Substanz vollständig. Im Fall von DABP-GTP wurde zunächst für die G_{α} -Untereinheiten heterotrimer G-Proteine und dann in einer gründlicheren Untersuchung an Ras gezeigt, dass dieses Analogon effizient von diesen Proteinen hydrolysiert wird. Hierfür ist hauptsächlich die aromatische Aminogruppe verantwortlich, wie daran zu erkennen ist, dass MABP-GTP **35** nur sehr langsam hydrolysiert wird. Gln 61 ist für die Hydrolyse nicht notwendig. In der Tat hydrolysieren alle onkogenen Mutanten von Ras einschließlich der Gly12-Mutanten DABP-GTP effizienter als der Wildtyp.^[241] Dies ist ein sehr motivierendes Ergebnis in Hinblick auf die Entwicklung neuer Wirkstoffe, da es zeigt, dass onkogenes Ras im Prinzip dazu gebracht werden kann, die β, γ -Phosphatbindung effizient zu lösen, wenn im aktiven Zentrum die passende chemische Umgebung geschaffen wird. Offensichtlich sind die GTP-Analoga selbst keine guten Leitsubstanzen, da die hohe Konzentration an GTP in der Zelle und dessen hohe Affinität zu Ras diesen Ansatz undurchführbar machen. Der Ansatz wird aber sinnvoll, wenn nach niedermolekularen Substanzen gesucht wird, die auf das aktive Zentrum von Ras zielen und reaktive chemische Gruppen tragen, wie die Untersuchungen an GAP und DABP-GTP andeuten. Die Struktur von Ras mit gebundenem DABP-GTP^[241] sollte beim Entwurf eines passenden Gerüsts für eine auf die GTPase-Reaktion gerichtete Leitsubstanz hilfreich sein.

3.5. Inhibierung der Wechselwirkung von Ras mit Effektormolekülen

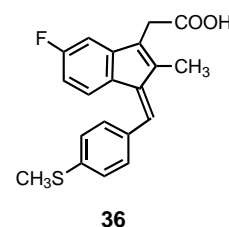
Die Wechselwirkung von Ras mit Downstream-Effektoren zählt zu den Schlüsselereignissen bei der Ras-vermittelten Signaltransduktion. Ein wichtiger Effektor ist die Raf-Serin/Threonin-Kinase, aber die Funktion von Ras wird durch die Wechselwirkung mit verschiedenen Effektoren vermittelt. Die Inhibierung der Wechselwirkung von Ras mit einem oder mehreren seiner Downstream-Effektoren könnte neue Alternativen eröffnen, in den Ras-Signalweg einzugreifen oder ihn

gar zu regulieren. Obwohl die funktionell verschiedenen Effektoren über ein gemeinsames Strukturmotiv verfügen, weisen sie keinerlei Sequenzhomologien auf und nutzen verschiedene Aminosäuren für die Wechselwirkung mit Ras. Demzufolge erscheint es möglich, selektive Inhibitoren zu entwickeln.

Durch Verwendung von Peptiden, die der Ras-Effektorregion oder den Ras-bindenden Domänen der Effektoren entsprechen, konnte nachgewiesen werden, dass dies in der Tat möglich ist. Die Wechselwirkung zwischen c-Raf-1 und Ras·GTP wurde sowohl durch Pentadecapeptide^[242] als auch durch Hepta- und Octapeptide, die von der Ras-bindenden Domäne von Raf-1 abgeleitet wurden, erfolgreich inhibiert.^[106, 243] Einige dieser Substanzen inhibierten die Ras-Raf-Bindung mit IC_{50} -Werten von $7\text{ }\mu\text{M}$ (Wert für eines der Heptapeptide) und blockierten die Ras-vermittelte Aktivierung der MAP-Kinase. Da diese Peptide nicht auf der Grundlage der Wechselwirkungsfläche des Ras·Raf-RBD-Komplexes, wie sie aus der dreidimensionalen Struktur^[115, 117] bestimmt werden kann, abgeleitet wurden, ist in vielen Fällen der Grund für die Inhibierung nicht offensichtlich. Einige 13–28 Aminosäuren lange Peptide, die von der H-Ras-Effektorbinderegion abgeleitet wurden und verschiedene Aminosäuresubstituenten enthalten, wurden als Inhibitoren der Assoziation von Ras mit verschiedenen Effektoren untersucht.^[244] Die der originalen H-Ras-Sequenz entsprechenden Peptide inhibierten die Assoziation von Ras mit drei Effektoren mit K_i -Werten von $1\text{--}10\text{ }\mu\text{M}$. Die Einführung von Aminosäuresubstituenten, die Mutationen in Ras entsprechen, führte zu Peptiden, die selektiv eine oder zwei Ras-Effektor-Wechselwirkungen inhibierten. Somit wurde die mit dem gesamten Ras-Protein beobachtete Spezifität in einem Peptid der Effektorregion beibehalten. Diese Ergebnisse legen nahe, dass es prinzipiell möglich sein sollte, kleine Moleküle als Inhibitoren Ras-vermittelter Protein-Protein-Wechselwirkungen zu entwickeln. Dies wird im Allgemeinen als schwierig angesehen, da die Wechselwirkungsfläche im Normalfall ein großes, für Lösungsmittel nicht zugängliches Gebiet von $1000\text{--}5000\text{ }\text{\AA}^2$ ist (im Falle von Ras·Raf-RBD: $1300\text{ }\text{\AA}^2$). Zusätzlich sind Protein-Protein-Wechselwirkungsflächen recht flach und enthalten keine tiefen, wassergefüllten Taschen, wie sie in aktiven Zentren gefunden werden. Darüber hinaus haben Mutationsanalysen ergeben, dass die Aminosäuren in der Wechselwirkungsfläche eines Protein·Protein-Komplexes nicht alle in gleichem Maße zur Bindungsenergie beitragen. Zuweilen sind ein bis drei Aminosäuren für den Großteil der Bindungsenergie verantwortlich, und dies in einer Weise, die keinesfalls offensichtlich aus der Struktur ableitbar ist.^[245–247] Daher wird es nötig sein, neue Arten von Gerüsten zu konstruieren, die eine große Oberfläche bedecken und spezifisch für das fragliche Protein entworfen werden.

Ein erfolgreicher Kandidat zur Inhibierung der Ras-Raf-Wechselwirkung ist der NSAI-Wirkstoff Sulindac-Sulfid **36** (NSAID = Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug; Schema 22).^[248] Sulindac selbst wurde in der Therapie von Tumoren bei Patienten mit der erbten Krebsdisposition Familiäre Adenomatöse Polyposis^[249, 250] eingesetzt und scheint gegen Tumore gerichtet zu sein, die ein Ras-Onkogen

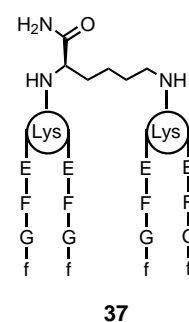
enthalten.^[251] Jüngste biochemische und zellbiologische Untersuchungen legen nahe, dass Sulindac-Sulfid die Ras-Transformation inhibiert und dies offensichtlich durch die Blockierung der Ras-Raf-Wechselwirkung.^[248] Sulindac ist eine viel versprechende Leitstruktur, auch wenn seine Affinität gegenwärtig noch zu niedrig ist, um ein wichtiger Wirkstoff zu sein.



Schema 22. Sulindac-Sulfid, ein Inhibitor der Ras-Raf-Wechselwirkung.

3.6. Weitere Ansätze

Zusätzlich zu den in den Abschnitten 3.1 bis 3.5 zusammengefassten Strategien wurden noch weitere Ansätze erprobt, die Wirkung von Ras zu stören. Beispielsweise wurden RNA-Aptamere gegen das farnesylierte Peptid Boc-Cys-Lys-Ser-Lys-Thr-Lys-Cys(Farn)-OH selektiert, das dem C-Terminus von K-Ras nachgebildet wurde.^[252] Die Peptide wurden über eine Disulfidbrücke mit ihrem N-terminalen Cysteinrest an einer Chromatographiesäule immobilisiert. Nach zehn Selektionsrunden wurden die bindenden RNA-Aptamere analysiert und man erhielt zwei Konsensussequenzen: GGGUGGG und GGGAGGG. Diese wiesen Bindungsaffinitäten von 139 und 930 nM für das farnesylierte Peptid auf und banden die nichtfarnesylierten Peptide mindestens zehnfach schwächer. Solche hochaffinen Aptamere, die den hydrophoben farnesylierten C-Terminus von K-Ras spezifisch erkennen, könnten nützlich sein, um die Funktion des Proteins zu beeinträchtigen. Die Aptamere könnten zur Komplexierung von farnesyliertem Ras eingesetzt werden und somit dessen Verankerung an der Zellmembran verhindern, was zu einem Verlust der Ras-Funktionen führt. In einem verwandten Ansatz wurde eine Bibliothek aus verzweigten Peptidmolekülen hergestellt und hinsichtlich ihrer Fähigkeit selektiert, den nichtfarnesylierten C-Terminus von H-Ras zu binden.^[253] Aus der gesamten Bibliothek aus mehr als 150000 Verbindungen wurden einzelne Substanzen identifiziert und daraufhin untersucht, ob sie die Farnesylierung von Ras-Peptiden und GFP-CAAX-Fusionsproteinen verhindern können (GFP = Green Fluorescent Protein). Die Verbindung **37** (Schema 23) inhibierte sequenzselektiv die Farnesylierung eines H-Ras-Peptids mit einem IC_{50} -Wert von $100\text{ }\mu\text{M}$. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass es die Ras-Prozessierung nicht nur durch Störung des Enzyms verhindert werden kann, sondern auch dadurch, dass dem Enzym der Zugang zu seinem Substrat mit einem synthetischen Molekül, welches das Substrat maskiert, verwehrt wird.



Schema 23. Ein aus einer Substanzbibliothek identifiziertes verzweigtes Peptid, das an H-Ras-Peptide und GFP-CAAX-Fusionsproteine (GFP = Green Fluorescent Protein) bindet und deren Farnesylierung verhindert.

In einem weiteren Ansatz wurden Antisense-Oligonucleotide entworfen, die mit dem H-Ras-mRNA-Codon 12 wechselwirken, d. h. an der Stelle, an der die onkogene Mutation auftritt, und so die Expression von mutiertem H-Ras inhibieren.^[254] Nach Adsorption an polymere Nanopartikel inhibierten diese Oligonucleotide das neoplastische Wachstum von HBL100Ras1 in Nacktmäusen.

4. Zusammenfassung

Viele Signalwege von außerhalb ins Innere der Zelle benutzen das Ras-Protein für die Weiterleitung des Signals. Ras ist ein GTP-bindendes Protein, das über obligatorische posttranslationale Modifikationen an die Plasmamembran angeheftet ist. Es wird von Guaninnucleotid-Austauschfaktoren an der Plasmamembran aktiviert, d. h. in die GTP-gebundene Form gebracht. Es wechselwirkt mit diversen Effektoren, die alle eine ähnlich strukturierte Ras-bindende Domäne enthalten. Da die Effektoren keine Sequenzhomologien aufweisen, benutzen sie unterschiedliche Aminosäuren für die Wechselwirkung mit Ras. Um den Cyclus zu schließen, wird Ras durch GTPase-aktivierende Proteine ausgeschaltet, die die langsame intrinsische GTPase-Reaktion durch die Vervollständigung des aktiven Zentrums beschleunigen.

Da Ras das häufigste Onkogen in menschlichen Tumoren ist, wird es bereits seit langem als attraktives Target in der Antikrebstherapie angesehen. Mögliche Ziele, um die Ras-Funktion zu stören, sind die Wechselwirkungen mit Regulatoren und Effektoren, die posttranslationalen Modifikationen und die GTPase-Reaktion. In diesem Artikel haben wir gezeigt, dass diverse Versuche unternommen wurden, die Ras-Aktivität in der Zelle zu inhibieren. Der vielversprechendste und am weitesten entwickelte dieser Ansätze ist gegenwärtig die Inhibierung des Enzyms Farnesyl-Transferase, das die lipophile Isoprenylgruppe an den C-terminalen Cysteinrest des reifen Proteins hängt und somit essentiell für die Ras-Funktion ist. Obwohl FTase-Inhibitoren in normalen Zellen nicht giftig sind und sich in verschiedenen Phasen klinischer Versuche befinden, ist ihre Wirksamkeit und ihr Wirkungsmechanismus noch immer nicht vollständig verstanden.

Die Autoren danken Dipl.-Biol. Thilo Brinkmann für die Durchsicht und die Übersetzung des Manuskripts.

Eingegangen am 31. Januar 2000 [A391]

- [1] S. L. Campbell, R. Khosravifar, K. L. Rossman, G. J. Clark, C. J. Der, *Oncogene* **1998**, 17, 1395–1413.
- [2] D. R. Lowy, B. M. Willumsen, *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, 62, 851–891.
- [3] J. Downward, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1998**, 8, 49–54.
- [4] M. T. Burgering, J. L. Bos, *Trends Biochem. Sci.* **1995**, 20, 18–22.
- [5] M. Barbacid, *Ann. Rev. Biochem.* **1987**, 56, 779–827.
- [6] B. M. Willumsen, A. Christensen, N. L. Hubbert, A. G. Papageorge, D. R. Lowy, *Nature* **1984**, 310, 583–586.
- [7] C. Rommel, E. Hafen, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1998**, 8, 412–418.
- [8] P. W. Sternberg, M. Han, *Trends Genet.* **1998**, 14, 466–472.
- [9] R. Marais, C. J. Marshall, *Cancer Surv.* **1996**, 27, 101–125.
- [10] G. Daum, I. Eisenmann-Tappe, H.-W. Fries, J. Troppmair, U. R. Rapp, *Trends Biochem. Sci.* **1994**, 19, 474–480.
- [11] F. McCormick, A. Wittinghofer, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1996**, 7, 449–456.
- [12] D. K. Morrison, R. E. Cutler, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1997**, 9, 174–179.
- [13] C. Block, A. Wittinghofer, *Structure* **1995**, 3, 1281–1284.
- [14] T. Pawson, J. D. Scott, *Science* **1997**, 278, 2075–2080.
- [15] C. J. Molloy, D. P. Bottaro, T. P. Fleming, M. S. Marshall, J. B. Gibbs, S. A. Aaronson, *Nature* **1989**, 343, 711–714.
- [16] D. Anderson, C. A. Koch, L. Grey, C. Ellis, M. F. Moran, T. Pawson, *Science* **1990**, 250, 979–982.
- [17] D. R. Kaplan, D. K. Morrison, G. Wong, F. McCormick, L. T. Williams, *Cell* **1990**, 61, 125–133.
- [18] A. Kazlauskas, C. Ellis, T. Pawson, J. A. Cooper, *Science* **1990**, 247, 1578–1581.
- [19] M. F. Moran, P. Polakis, F. McCormick, T. Pawson, C. Ellis, *Mol. Cell. Biol.* **1991**, 11, 1804–1812.
- [20] L. Buday, P. H. Warne, J. Downward, *Oncogene* **1995**, 11, 1327–1331.
- [21] A. D. Cherniack, J. K. Klarlund, B. R. Conway, M. P. Czeck, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 1485–1488.
- [22] S. B. Waters, K. Yamauchi, J. E. Pessin, *Mol. Cell. Biol.* **1995**, 15, 2791–2799.
- [23] D. Chen, S. B. Waters, K. H. Holt, J. E. Pessin, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 6328–6332.
- [24] M. A. White, C. Nicolette, A. Minden, A. Polverino, L. Van Aelst, M. Karin, M. H. Wigler, *Cell* **1995**, 80, 1–20.
- [25] R.-G. Qiu, J. Chen, F. McCormick, M. Symons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 11781–11785.
- [26] R.-G. Qiu, A. Abo, F. McCormick, M. Symons, *Mol. Cell. Biol.* **1997**, 17, 3449–3458.
- [27] T. Joneson, M. A. White, M. H. Wigler, D. Barsagi, *Science* **1996**, 271, 810–812.
- [28] R. Khosravi-Far, P. A. Solski, G. J. Clark, M. S. Kinch, C. J. Der, *Mol. Cell. Biol.* **1995**, 15, 6443–6453.
- [29] P. Rodriguez-Viciana, P. H. Warne, R. Dhand, B. Vanhaesebroeck, I. Gout, M. J. Fry, M. D. Waterfield, J. Downward, *Nature* **1994**, 370, 527–532.
- [30] T. Kodaki, R. Woscholski, B. Hallberg, P. Rodriguez-Viciana, J. Downward, P. J. Parker, *Curr. Biol.* **1994**, 4, 798–806.
- [31] B. Stoyanov, S. Volinia, T. Hanck, I. Rubio, M. Loubtchenkov, D. Malek, S. Stoyanova, B. Vanhaesebroeck, R. Dhand, B. Nürnberg, P. Gierschik, K. Seedorf, J. J. Hsuan, M. D. Waterfield, R. Wetzker, *Science* **1995**, 269, 690–693.
- [32] F. Hofer, S. Fields, C. Schneider, G. S. Martin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 11089–11093.
- [33] A. Kikuchi, S. D. Demo, Zhi-Hai Ye, Y.-W. Chen, L. T. Williams, *Mol. Cell. Biol.* **1994**, 14, 7483–7491.
- [34] M. Spargaaren, J. R. Bischoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 12609–12613.
- [35] R. M. F. Wolthuis, B. Bauer, L. J. Vantveer, A. M. M. Devriessmits, R. H. Cool, M. Spaargaren, A. Wittinghofer, B. M. T. Burgering, J. L. Bos, *Oncogene* **1996**, 13, 353–362.
- [36] S. N. Peterson, L. Trabalzi, T. R. Brtva, T. Fischer, D. L. Altschuler, P. Martelli, E. G. Lapetina, C. J. Der, G. C. White II, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 29903–29908.
- [37] B. M. Willumsen, A. Christensen, N. L. Hubbert, A. G. Papageorge, D. R. Lowy, *Nature* **1984**, 310, 583–586.
- [38] A. D. Cox, C. J. Der, *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, 1333, F51–F71.
- [39] J. F. Hancock, A. I. Magee, J. E. Childs, C. J. Marshall, *Cell* **1989**, 57, 1167–1177.
- [40] J. F. Hancock, H. Paterson, C. J. Marshall, *Cell* **1990**, 63, 133–139.
- [41] J. John, M. Frech, J. Feuerstein, R. S. Goody, A. Wittinghofer in *Guanine-Nucleotide-Binding Proteins* (Hrsg.: L. Bosch, B. Kraal, A. Partmeggiani), Plenum, New York, **1989**, S. 209–214.
- [42] J. Feuerstein, R. S. Goody, A. Wittinghofer, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 8455–8458.
- [43] J. John, R. Sohmen, J. Feuerstein, R. Linke, A. Wittinghofer, R. S. Goody, *Biochemistry* **1990**, 29, 6059–6065.
- [44] S. E. Neal, J. F. Eccleston, M. R. Webb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 3652–3656.
- [45] G. Schmidt, C. Lenzen, I. Simon, R. Deuter, R. H. Cool, R. S. Goody, A. Wittinghofer, *Oncogene* **1996**, 12, 87–96.

- [46] J. John, M. Frech, A. Wittinghofer, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 11792–11799.
- [47] A. Hall, A. Self, *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 10963–10965.
- [48] H. Rensland, J. John, R. Linke, I. Simon, I. Schlichting, A. Wittinghofer, R. S. Goody, *Biochemistry* **1995**, 34, 593–599.
- [49] E. F. Pai, W. Kabsch, U. Krengel, K. C. Holmes, J. John, A. Wittinghofer, *Nature* **1989**, 341, 209–214.
- [50] E. F. Pai, U. Krengel, G. A. Petsko, R. S. Goody, W. Kabsch, A. Wittinghofer, *EMBO J.* **1990**, 9, 2351–2359.
- [51] M. V. Milburn, L. Tong, A. M. DeVos, A. Brünger, Z. Yamaizumi, S. Nishimura, S.-H. Kim, *Science* **1990**, 247, 939–945.
- [52] G. G. Privé, M. V. Milburn, L. Tong, A. M. DeVos, Z. Yamaizumi, S. Nishimura, S. H. Kim, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 3649–3653.
- [53] K. R. Halliday, *J. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.* **1984**, 9, 435–448.
- [54] H. R. Bourne, D. A. Sanders, F. McCormick, *Nature* **1990**, 348, 125–132.
- [55] H. R. Bourne, D. A. Sanders, F. McCormick, *Nature* **1991**, 349, 117–127.
- [56] A. Valencia, P. Chardin, A. Wittinghofer, C. Sander, *Biochemistry* **1991**, 30, 4637–4648.
- [57] L. A. Feig, G. M. Cooper, *Mol. Cell. Biol.* **1988**, 8, 3235–3243.
- [58] C. L. Farnsworth, L. A. Feig, *Mol. Cell. Biol.* **1991**, 11, 4822–4829.
- [59] J. John, H. Rensland, I. Schlichting, I. Vetter, G. D. Borasio, R. S. Goody, A. Wittinghofer, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 923–929.
- [60] A. Wittinghofer, E. F. Pai, *Trends Biochem. Sci.* **1991**, 16, 382–387.
- [61] L. A. Feig, B.-T. Pan, T. M. Roberts, G. M. Cooper, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, 83, 4607–4611.
- [62] J.-M. Zhong, M.-C. Chen-Hwang, Y.-W. Hwang, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 10002–10007.
- [63] A. Weijland, A. Parmeggiani, *Science* **1993**, 259, 1311–1314.
- [64] C. J. Der, B. Weissmann, M. J. MacDonald, *Oncogene* **1988**, 3, 105–112.
- [65] I. Simon, M. Zerial, R. S. Goody, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 20470–20478.
- [66] T. Powers, P. Walter, *Science* **1995**, 269, 1422–1424.
- [67] I. Schlichting, S. C. Almo, G. Rapp, K. Wilson, K. Petratos, A. Lentfer, A. Wittinghofer, W. Kabsch, E. F. Pai, G. A. Petsko, R. S. Goody, *Nature* **1990**, 345, 309–315.
- [68] A. Wittinghofer, N. Nassar, *Trends Biochem. Sci.* **1996**, 21, 488–491.
- [69] A. J. Scheidig, S. M. Franken, J. E. T. Corrie, G. P. Reid, A. Wittinghofer, E. F. Pai, R. S. Goody, *J. Mol. Biol.* **1995**, 253, 132–150.
- [70] A. J. Scheidig, C. Burmester, R. S. Goody, *Structure* **1999**, 7, 1311–1324.
- [71] U. Krengel, I. Schlichting, A. Scherer, R. Schumann, M. Frech, J. John, W. Kabsch, E. F. Pai, A. Wittinghofer, *Cell* **1990**, 62, 539–548.
- [72] S. M. Franken, A. J. Scheidig, U. Krengel, H. Rensland, A. Lautwein, M. Geyer, K. Scheffzek, R. S. Goody, H. R. Kalbitzer, E. F. Pai, A. Wittinghofer, *Biochemistry* **1993**, 32, 8411–8420.
- [73] J. Downward, J. D. Graves, P. H. Warne, S. Rayter, D. A. Cantrell, *Nature* **1990**, 346, 719–723.
- [74] J. Downward, *Cancer Surv.* **1996**, 27, 87–100.
- [75] L. Buday, J. Downward, *Cell* **1993**, 73, 611–620.
- [76] P. Chardin, J. H. Camonis, N. W. Gale, L. van Aelst, J. Schlessinger, M. H. Wigler, D. Bar-Sagi, *Science* **1993**, 260, 1338–1343.
- [77] S. E. Egan, B. W. Giddings, M. W. Brooks, L. Buday, A. M. Sizeland, R. A. Weinberg, *Nature* **1993**, 363, 45–51.
- [78] N. Li, A. Batzer, R. Daly, V. Yajnik, E. Skolnik, P. Chardin, D. Bar-Sagi, B. Margolis, J. Schlessinger, *Nature* **1993**, 363, 85–88.
- [79] M. R. Rozakis-Adcock, R. Fernley, J. Wade, T. Pawson, D. Bowtell, *Nature* **1993**, 363, 83–85.
- [80] C. Shou, C. L. Farnsworth, B. G. Neel, L. A. Feig, *Nature* **1992**, 358, 3512–3518.
- [81] E. Martegani, M. Vanoni, R. Zippel, P. Coccetti, R. Brambilla, C. Ferrari, E. Sturani, L. Alberghina, *EMBO J.* **1992**, 11, 2151–2157.
- [82] J. O. Ebinu, D. A. Bottorff, E. Y. W. Chan, S. L. Stang, R. J. Dunn, J. C. Stone, *Science* **1998**, 280, 1082–1086.
- [83] C. E. Togonon, H. E. Kirk, L. A. Passmore, I. P. Whitehead, C. J. Der, R. J. Kay, *Mol. Cell. Biol.* **1998**, 18, 6995–7008.
- [84] C. Lenzen, R. H. Cool, H. Prinz, J. Kuhlmann, A. Wittinghofer, *Biochemistry* **1998**, 37, 7420–7430.
- [85] N. P. Fam, W. T. Fan, Z. X. Wang, L. J. Zhang, H. Chen, M. F. Moran, *Mol. Cell. Biol.* **1997**, 17, 1396–1406.
- [86] C. Klebe, F. R. Bischoff, H. Ponstingl, A. Wittinghofer, *Biochemistry* **1995**, 34, 639–647.
- [87] C. Klebe, H. Prinz, A. Wittinghofer, R. S. Goody, *Biochemistry* **1995**, 34, 12543–12552.
- [88] S. Powers, K. O'Neill, M. Wigler, *Mol. Cell. Biol.* **1989**, 9, 390–395.
- [89] S. A. Haney, J. R. Broach, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 16541–16548.
- [90] E. Jacquet, S. Baouz, A. Parmeggiani, *Biochemistry* **1995**, 34, 12347–12354.
- [91] P. A. Boriack-Sjodin, S. M. Margarit, D. Bar-Sagi, J. Kuriyan, *Nature* **1998**, 394, 337–343.
- [92] T. Schweins, A. Wittinghofer, *Curr. Biol.* **1994**, 4, 547–550.
- [93] P. Polakis, F. McCormick, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 9157–9160.
- [94] M.-Y. Mistou, E. Jacquet, P. Poulet, H. Rensland, P. Gideon, I. Schlichting, A. Wittinghofer, A. Parmeggiani, *EMBO J.* **1992**, 11, 2391–2398.
- [95] M. Saraste, P. R. Sibbald, A. Wittinghofer, *Trends Biochem. Sci.* **1990**, 15, 430–434.
- [96] I. S. Sigal, J. B. Gibbs, J. S. D'Alonzo, G. L. Temeles, B. D. Wolanski, S. H. Socher, E. M. Scolnick, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, 83, 952–956.
- [97] A. Wittinghofer, *Biol. Chem.* **1998**, 379, 933–937.
- [98] A. B. Vojtek, S. M. Hollenberg, J. A. Cooper, *Cell* **1993**, 74, 205–214.
- [99] J. E. Scheffler, D. S. Waugh, E. Bekesi, S. E. Kiefer, J. E. LoSardo, A. Neri, K. M. Prinzo, K.-L. Tsao, B. Wegrzynski, S. D. Emerson, D. C. Fry, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 22340–22346.
- [100] C. Herrmann, G. A. Martin, A. Wittinghofer, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 2901–2905.
- [101] H. Koide, T. Satoh, M. Nakafuku, Y. Kaziro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 8683–8686.
- [102] L. van Aelst, M. Barr, S. Marcus, A. Polverino, M. Wigler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 6213–6217.
- [103] S. A. Moodie, B. M. Willumsen, M. J. Weber, A. Wolfman, *Science* **1993**, 260, 1658–1661.
- [104] X.-f. Zhang, J. Settleman, J. M. Kyriakis, E. Takeuchi-Suzuki, S. J. Elledge, M. S. Marshall, J. T. Bruder, U. R. Rapp, J. Avruch, *Nature* **1993**, 364, 308–313.
- [105] T. R. Brtva, J. K. Drugan, S. Ghosh, R. S. Terrell, S. Campbell-Burk, R. M. Bell, C. J. Der, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 9809–9812.
- [106] G. J. Clark, J. K. Drugan, R. S. Terrell, C. Bradham, C. J. Der, R. M. Bell, S. Campbell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 1577–1581.
- [107] C.-D. Hu, K.-i. Kariya, M. Tamada, K. Akasaka, M. Shirouzu, S. Yokoyama, T. Kataoka, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 30274–30277.
- [108] Z. Luo, B. Diaz, M. S. Marshall, J. Avruch, *Mol. Cell. Biol.* **1997**, 17, 46–53.
- [109] S. Gosh, W. Q. Xie, A. F. G. Quest, G. M. Mabrouk, J. C. Strum, R. M. Bell, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 10000–10007.
- [110] J. A. Thorson, L. W. K. Yu, A. L. Hsu, N. Y. Shih, P. R. Graves, J. W. Tanner, P. M. Allen, H. Piwnicaworms, A. S. Shaw, *Mol. Cell. Biol.* **1998**, 18, 5229–5238.
- [111] S. Roy, R. A. McPherson, A. Apolloni, J. Yan, A. Lane, J. Clyde-Smith, J. F. Hancock, *Mol. Cell. Biol.* **1999**, 19, 3947–3955.
- [112] M. Daub, J. Jöckel, T. Quack, C. K. Weber, F. Schmitz, U. R. Rapp, A. Wittinghofer, C. Block, *Mol. Cell Biol.* **1998**, 8, 6698–6710.
- [113] S. D. Emerson, V. S. Madison, R. E. Palermo, D. S. Waugh, J. E. Scheffler, L.-L. Tsao, S. E. Kiefer, S. P. Liu, D. C. Fry, *Biochemistry* **1995**, 34, 6911–6918.
- [114] T. Terada, Y. Ito, M. Shirouzu, M. Tateno, K. Hashimoto, T. Kigawa, T. Ebisuzaki, K. Takio, T. Shibata, S. Yokoyama, B. O. Smith, E. D. Laue, J. A. Coper, *J. Mol. Biol.* **1999**, 286, 219–232.
- [115] N. Nassar, G. Horn, C. Herrmann, A. Scherer, F. McCormick, A. Wittinghofer, *Nature* **1995**, 375, 554–560.
- [116] C. Herrmann, G. Horn, M. Spaargaren, A. Wittinghofer, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 6794–6800.
- [117] N. Nassar, G. Horn, C. Herrmann, C. Block, R. Janknecht, A. Wittinghofer, *Nat. Struct. Biol.* **1996**, 3, 723–729.
- [118] H. R. Mott, J. W. Carpenter, S. Zhong, S. Ghosh, R. M. Bell, S. L. Campbell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 8312–8317.
- [119] G. Zhang, M. G. Kazanietz, P. M. Blumberg, J. H. Hurley, *Cell* **1995**, 81, 917–924.

- [120] M. Geyer, C. Herrmann, S. Wohlgemuth, A. Wittinghofer, H. R. Kalbitzer, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, 4, 694–699.
- [121] L. Huan, X. Weng, F. Hofer, G. S. Martin, S.-H. Kim, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, 4, 609–615.
- [122] D. Esser, B. Bauer, R. M. F. Wolthuis, A. Wittinghofer, R. H. Cool, P. Bayer, *Biochemistry* **1998**, 37, 13453–13462.
- [123] T. Kigawa, M. Endo, Y. Ito, M. Shirouzu, A. Kikuchi, S. Yokoyama, *FEBS Lett.* **1998**, 441, 413–418.
- [124] L. Huang, F. Hofer, G. S. Martin, S.-H. Kim, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, 5, 422–426.
- [125] I. R. Vetter, C. Nowak, T. Nishimoto, J. Kuhlmann, A. Wittinghofer, *Nature* **1999**, 398, 39–46.
- [126] M. A. White, C. Nicolette, A. Minden, A. Polverino, L. Van Aelst, M. Karin, M. H. Wigler, *Cell* **1995**, 80, 1–20.
- [127] K. Akasaka, M. Tamada, F. Wang, K.-i. Kariya, F. Shima, A. Kikuchi, M. Yamamoto, M. Shirouzu, S. Yokoyama, T. Kataoka, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 5353–5360.
- [128] P. Rodriguez-Vician, P. H. Warne, B. Vanhaesebroeck, M. D. Waterfield, J. Downward, *EMBO J.* **1996**, 15, 2442–2451.
- [129] M. A. White, T. Vale, J. H. Camonis, E. Schaefer, M. H. Wigler, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 16439–16442.
- [130] R. Khosravi-Far, M. A. White, J. K. Westwick, P. A. Soltski, M. Chrzanowska-Wodnicka, L. van Aelst, M. H. Wigler, C. J. Der, *Mol. Cell. Biol.* **1996**, 16, 3923–3933.
- [131] R. M. F. Wolthuis, N. D. Deruiter, R. H. Cool, J. L. Bos, *EMBO J.* **1997**, 16, 6748–6761.
- [132] M. Shirouzu, K. Hashimoto, A. Kikuchi, S. Yokoyama, *Biochemistry* **1999**, 38, 5103–5110.
- [133] P. Rodriguez-Vician, P. H. Warne, R. Dhand, B. van Haesebroeck, I. Gout, M. J. Fry, M. D. Waterfield, J. Downward, *Nature* **1994**, 370, 527–532.
- [134] E. H. Walker, O. Perisic, C. Ried, L. Stephens, R. L. Williams, *Nature* **1999**, 402, 313–320.
- [135] L. van Aelst, M. A. White, M. H. Wigler, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **1994**, 59, 181–186.
- [136] M. Kuriyama, N. Harada, S. Kuroda, T. Yamamoto, M. Nakafuku, A. Iwamatsu, D. Yamamoto, R. Prasad, C. Croce, E. Canaani, K. Kaibuchi, *J. Biol. Chem.* **1995**, 271, 607–610.
- [137] T. Linnemann, M. Geyer, B. K. Jaitner, C. Block, H. R. Kalbitzer, A. Wittinghofer, C. Herrmann, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 13556–13562.
- [138] C. J. Der, T. Finkel, G. M. Cooper, *Cell* **1986**, 44, 167–176.
- [139] M. Frech, T. A. Darden, L. G. Pedersen, C. K. Foley, P. S. Charifson, M. W. Anderson, A. Wittinghofer, *Biochemistry* **1994**, 33, 3237–3244.
- [140] R. Langen, T. Schweins, A. Washel, *Biochemistry* **1992**, 31, 8691–8696.
- [141] H. H. Chung, D. R. Benson, P. G. Schultz, *Science* **1992**, 259, 806–809.
- [142] T. Schweins, M. Geyer, K. Scheffzek, A. Warshel, H. R. Kalbitzer, A. Wittinghofer, *Nat. Struct. Biol.* **1995**, 2, 36–44.
- [143] T. Schweins, M. Geyer, H. R. Kalbitzer, A. Wittinghofer, A. Warshel, *Biochemistry* **1996**, 35, 14225–14231.
- [144] T. Schweins, A. Warshel, *Biochemistry* **1996**, 35, 14232–14243.
- [145] J. Sondek, D. G. Lambright, J. P. Noel, H. E. Hamm, P. B. Sigler, *Nature* **1994**, 372, 276–279.
- [146] M. Trahey, F. McCormick, *Science* **1987**, 238, 542–545.
- [147] U. S. Vogel, R. A. F. Dixon, M. D. Schaber, R. E. Diehl, M. S. Marshall, E. M. Scolnick, I. S. Sigal, J. B. Gibbs, *Nature* **1988**, 335, 90–93.
- [148] M. Trahey, G. Wong, R. Halenbeck, B. Rubinfeld, G. A. Martin, M. Ladner, C. M. Long, W. J. Crosier, K. Watt, K. Koths, F. McCormick, *Science* **1988**, 242, 1697–1700.
- [149] G. Xu, P. O’Connel, D. Viskochil, R. Cawthon, M. Robertson, M. Culver, D. Dunn, J. Stevens, R. Gesteland, R. White, R. Weiss, *Cell* **1990**, 62, 599–608.
- [150] G. A. Martin, D. Viskochil, G. Bollag, P. C. McCabe, W. J. Crosier, H. Haubruck, L. Conroy, R. Clark, P. O’Connel, R. M. Cawthon, M. A. Innis, F. McCormick, *Cell* **1991**, 63, 843–849.
- [151] G. Xu, B. Lin, K. Tanaka, D. Dunn, D. Wood, R. Gesteland, R. White, R. Weiss, F. Tamanoi, *Cell* **1991**, 63, 835–841.
- [152] R. Ballester, D. Marchuk, M. Boguski, A. Saulino, R. Letcher, M. Wigler, F. Collins, *Cell* **1990**, 63, 851–859.
- [153] M. S. Marshall, W. S. Hill, A. S. Ng, U. S. Vogel, M. D. Schaber, E. M. Scolnick, R. A. F. Dixon, I. Sigal, J. B. Gibbs, *EMBO J.* **1989**, 8, 1105–1110.
- [154] L. Wiesmüller, A. Wittinghofer, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 10207–10210.
- [155] M. R. Ahmadian, L. Wiesmüller, A. Lautwein, F. R. Bischoff, A. Wittinghofer, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 16409–16415.
- [156] P. Gideon, J. John, M. Frech, A. Lautwein, R. Clark, J. E. Scheffler, A. Wittinghofer, *Mol. Cell. Biol.* **1992**, 12, 2050–2056.
- [157] J. F. Eccleston, K. J. M. Moore, L. Morgan, R. H. Skinner, P. N. Lowe, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 27012–27019.
- [158] M. S. Moore, G. Blobel, *Nature* **1993**, 365, 661–663.
- [159] H. Rensland, A. Lautwein, A. Wittinghofer, R. S. Goody, *Biochemistry* **1991**, 30, 11181–11185.
- [160] M. Chabre, *Trends Biochem. Sci.* **1990**, 15, 6–10.
- [161] R. Mittal, M. R. Ahmadian, R. S. Goody, A. Wittinghofer, *Science* **1996**, 273, 115–117.
- [162] M. R. Ahmadian, U. Hoffmann, R. S. Goody, A. Wittinghofer, *Biochemistry* **1997**, 36, 4535–4541.
- [163] K. Scheffzek, A. Lautwein, W. Kabsch, M. R. Ahmadian, A. Wittinghofer, *Nature* **1996**, 384, 591–596.
- [164] K. Scheffzek, M. R. Ahmadian, W. Kabsch, L. Wiesmüller, A. Lautwein, F. Schmitz, A. Wittinghofer, *Science* **1997**, 277, 333–338.
- [165] A. Sermon, P. N. Lowe, M. Strom, J. F. Eccleston, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 9480–9485.
- [166] G. Bollag, F. McCormick, *Nature* **1991**, 351, 576–579.
- [167] M. S. Marshall, L. A. Hettich, *Oncogene* **1993**, 8, 425–431.
- [168] K. Rittinger, P. A. Walker, J. F. Eccleston, K. Nurmahomed, D. Owen, E. Laue, S. J. Smerdon, *Nature* **1997**, 388, 693–697.
- [169] K. Rittinger, P. A. Walker, J. F. Eccleston, S. J. Smerdon, S. J. Gamblin, *Nature* **1997**, 389, 758–762.
- [170] N. Nassar, G. R. Hoffman, D. Manor, J. C. Clardy, R. A. Cerione, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, 5, 1047–1052.
- [171] M. R. Ahmadian, R. Mittal, A. Hall, A. Wittinghofer, *FEBS Lett.* **1997**, 408, 315–318.
- [172] O. Müller, I. Nimmrich, U. Finke, W. Friedl, I. Hoffmann, *Genes Chromosomes Cancer* **1998**, 22, 37–41.
- [173] A. Leonard, R. Lin, R. A. Cerione, D. Manor, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 16210–16215.
- [174] L. Graham, J. F. Eccleston, P. N. Lowe, *Biochemistry* **1999**, 38, 985–991.
- [175] K. Scheffzek, M. R. Ahmadian, A. Wittinghofer, *Trends Biochem. Sci.* **1998**, 23, 257–262.
- [176] J. K. Buolamwini, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3, 500–509.
- [177] K. G. Waddick, F. M. Uckun, *Biochem. Pharmacol.* **1998**, 56, 1411–1426.
- [178] A. Levitzki, *Eur. J. Biochem.* **1994**, 226, 1–13.
- [179] T. Dudler, M. H. Gelb, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 11541–11547.
- [180] J. F. Moomaw, P. J. Casey, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 17438–17443.
- [181] Y. Reiss, M. S. Brown, J. L. Goldstein, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 6403–6408.
- [182] D. M. Leonard, *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 2971–2990.
- [183] J. E. Buss, J. C. Marsters, Jr., *Chem. Biol.* **1995**, 2, 787–791.
- [184] J. B. Gibbs, S. L. Graham, G. D. Hartmann, K. S. Voblau, N. E. Vohl, C. A. Omer, A. Oliff, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, 1, 197–203.
- [185] H. W. Park, S. R. Boduhere, J. F. Mowaw, P. J. Casey, L. S. Beese, *Science* **1997**, 275, 1800–1807.
- [186] S. B. Long, P. J. Casey, L. S. Beese, *Biochemistry* **1998**, 37, 9612–9618.
- [187] N. E. Vohl, F. R. Wilson, S. D. Mosser, E. Guiliani, S. J. de Solms, M. W. Conner, N. J. Anthony, W. J. Holtz, R. P. Gomez, T. J. Lee, R. L. Smith, S. L. Graham, G. D. Hartman, J. B. Gibbs, A. Oliff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 9141–9145.
- [188] G. C. Prendergast, J. P. Davide, S. J. de Solms, E. Giuliani, S. L. Graham, J. B. Gibbs, A. Oliff, N. E. Vohl, *Mol. Cell. Biol.* **1994**, 14, 4193–4202.
- [189] P. Adamson, C. J. Marshall, A. Hall, P. A. Tilbrook, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 20033–20038.
- [190] W. Du, P. F. Lebowitz, G. C. Prendergast, *Mol. Cell. Biol.* **1999**, 19, 1831–1840.
- [191] P. F. Lebowitz, J. P. Davide, G. C. Prendergast, *Mol. Cell. Biol.* **1995**, 15, 6613–6622.
- [192] T. Nagasu, K. Yoshimatsu, C. Rowell, M. D. Lewis, A. M. Garcia, *Cancer Res.* **1995**, 55, 5310–5314.

- [193] K. Leftheris, T. Kline, G. D. Kite, Y. H. Cho, R. S. Bhide, D. V. Patel, M. Manorama, R. J. Schmidt, H. N. Weller, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 224–236.
- [194] J. T. Hunt, V. G. Lee, K. Leftheris, B. Seizinger, J. Carboni, J. Mabus, C. Ricca, N. Yan, V. Manne, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 353–358.
- [195] G. L. James, J. L. Goldstein, M. S. Brown, T. E. Rawson, T. C. Somers, R. S. Mc Dowell, C. W. Crowley, B. K. Lucas, A. D. Levinson, J. C. Marsters, Jr., *Science* **1993**, 260, 1937–1942.
- [196] G. L. James, M. S. Brown, M. H. Cobb, J. L. Goldstein, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 27705–27714.
- [197] M. Nigam, C.-M. Seong, Y. Qian, A. D. Hamilton, S. M. Sebti, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 20695–20698.
- [198] Y. Qian, M. A. Blaskovitch, M. Sahem, C. M. Seong, S. P. Wathen, A. D. Hamilton, S. M. Sebti, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 12410–12413.
- [199] E. C. Lerner, Y. Qian, M. A. Blaskovitch, R. D. Fossum, A. Vogt, J. Sun, A. D. Cox, C. J. Der, A. D. Hamilton, S. M. Sebti, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 26802–26806.
- [200] J. Sun, Y. Qian, M. A. Blaskovitch, A. D. Hamilton, *Cancer Res.* **1995**, 55, 4243–4247.
- [201] Y. Qian, A. Vogt, S. M. Sebti, A. D. Hamilton, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 217–223.
- [202] T. M. Williams, S. C. Ciccarone, S. C. Mac Tough, R. L. Bock, M. W. Connor, J. P. Davide, K. Hamilton, K. S. Koblan, N. E. Kohl, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 1345–1348.
- [203] a) D. V. Patel, E. M. Gordon, R. J. Schmidt, H. N. Weller, M. G. Young, R. Zahler, M. Barbacid, J. M. Carboni, J. L. Gullo-Brown, L. Hunikan, C. Ricca, S. Robinson, B. R. Seizinger, A. V. Tuomari, V. Manne, *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 435–442; b) V. Manne, N. Yan, J. M. Carboni, A. V. Tuomari, C. Ricca, J. Gullo-Brown, M. L. Andahazy, R. J. Schmidt, D. Patel, R. Zahler, R. Weinmann, C. J. Der, A. D. Cox, J. T. Hunt, E. M. Gordon, M. Barbacid, B. R. Seizinger, *Oncogene* **1995**, 10, 1763–1779.
- [204] N. Yan, C. Ricca, J. Fletcher, T. Glover, B. R. Seizinger, V. Manne, *Cancer Res.* **1995**, 55, 3569–3575.
- [205] M. Schlitzer, J. Sattler, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 2150–2152; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2032–2034.
- [206] a) K. Hinterding, P. Hagenbuch, J. Rétey, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 1298–1301; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 1236–1239; b) K. Hinterding, P. Hagenbuch, J. Rétey, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **1999**, 5, 227–236.
- [207] M. Hara, K. Akasaya, S. Akinaya, M. Ohabe, H. Nakano, R. Gomez, D. Wood, M. Uh, F. Tamanoi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 2281–2285.
- [208] S. B. Singh, E. T. Jones, M. A. Goetz, G. F. Bills, M. Nallin-Omstead, R. G. Jenkins, R. B. Kingham, K. C. Silverman, J. B. Gibbs, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 4963–4965.
- [209] S. B. Singh, D. L. Zink, J. M. Lesch, R. G. Ball, M. A. Goetz, E. A. Bolessa, R. A. Giacobbe, K. C. Silverman, G. F. Bills, F. Palaez, C. Cascales, J. B. Gibbs, R. B. Lingham, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 6296–6302.
- [210] D. M. Leonard, K. R. Schuber, C. J. Poulter, S. R. Eaton, T. K. Sawyer, J. C. Hodges, T.-Z. Su, J. D. Scholten, R. Gowan, J. S. Sebold-Leopold, A. M. Doherty, *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 192–200.
- [211] R. L. Rawls, *Chem. Eng. News* **1998**, 67–69.
- [212] A. K. Mallams, F. G. Njoroge, R. J. Doll, M. E. Snow, J. J. Kaminski, R. R. Rossmann, B. Vibulbhan, W. R. Bishop, P. Kirschmeier, P. Carruthers, J. K. Wong, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, 5, 93–99.
- [213] F. G. Njoroge, R. J. Doll, B. Vibulbhan, C. S. Alvarez, W. R. Bishop, J. Petrin, P. Kirschmeier, N. I. Carruthers, J. K. Wong, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, 5, 101–113.
- [214] N. E. Kohl, C. A. Omer, M. W. Conner, N. J. Anthony, J. P. Davide, S. J. de Solms, E. A. Guilian, P. R. Gomez, S. L. Graham, *Nat. Med.* **1995**, 1, 792–797.
- [215] S. M. Graham, A. B. Vojtek, S. Y. Huff, A. C. Cox, G. J. Clark, J. A. Woper, C. J. Der, *Mol. Cell Biol.* **1996**, 16, 6132–6140.
- [216] R. E. Finney, J. M. Bishop, *Science* **1993**, 260, 1524–1527.
- [217] G. L. James, J. L. Goldstein, M. S. Brown, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 4454–4458.
- [218] F. Lavell, *C. R. Seances Soc. Biol. Ses. Fil.* **1997**, 191, 211–219.
- [219] F. L. Zhang, C. D. Kirschmeier, L. James, R. W. Bond, L. Wang, R. Patton, W. T. Windsor, R. Syto, R. M. Zhang, W. R. Bishop, *J. Bio. Chem.* **1997**, 272, 10232–10239.
- [220] D. B. Whyte, P. Kirschmeier, N. N. Hockenberry, I. Nunez-Olivia, J. J. Catino, W. R. Bishop, J.-K. Pai, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 14459–14464.
- [221] C. A. Powell, J. J. Kowalczyk, M. D. Lewis, A. M. Garcia, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 14093–14097.
- [222] P. F. Lebowitz, J. P. Davide, G. C. Prendergast, *Mod. Cell Biol.* **1995**, 10, 2289–2296.
- [223] P. F. Lebowitz, P. J. Casey, G. C. Prendergast, J. A. Thießen, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 15591–15594.
- [224] G. J. Clark, M. S. Knich, K. Rogers-Graham, S. M. Sebti, A. D. Hamilton, C. J. Der, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 10608–10615.
- [225] P. F. Lebowitz, D. Sakamuro, G. C. Prendergast, *Cancer Res.* **1997**, 57, 708–713.
- [226] R. B. Lovell, N. E. Kohl, *Cancer Metastasis Rev.* **1998**, 17, 203–210.
- [227] Y. T. Ma, B. A. Gilbert, R. R. Rando, *Biochemistry* **1993**, 32, 2386–2393.
- [228] P. R. Rando, *Biochem. Biophys. Acta* **1996**, 1300, 5–16.
- [229] V. L. Boyartchuk, M. W. Ashby, J. Rine, *Science* **1997**, 275, 1796–1800.
- [230] E. W. Tan, D. Pérez-Sala, F. J. Canada, R. R. Rando, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 21515–21522.
- [231] a) J. T. Dunphy, M. E. Linder, *Biochem. Biophys. Acta* **1998**, 1436, 245–261, b) M. D. Resh, *Biochem. Biophys. Acta* **1999**, 1451, 1–16.
- [232] L. Liu, T. Dudler, M. Gelb, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 23269–23276.
- [233] J. A. Duncan, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 15830–15837.
- [234] G. Taveras, S. W. Remiszewski, R. J. Doll, D. Cesarz, E. C. Huang, P. Kirschmeier, B. N. Pramanik, M. E. Snow, Y. S. Wang, J. D. del Rasio, B. B. Bauer, J. E. Brown, D. Carr, J. Catino, C. A. Evans, V. Girijavallabhan, L. Heimark, J. L. Liverles, C. Nash, L. Perkins, M. M. Senior, A. Tsarapopoulos, A. K. Ganguly, R. Aust, E. Brown, D. Delisle, S. Fuhrmann, T. Hendrickson, C. Kissinger, R. Love, W. Sisson, E. Villafranca, S. E. Webber, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, 5, 125–133.
- [235] T. Noonan, N. Brown, L. Dudycz, G. Wright, *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 1303–1307.
- [236] R. Wolin, D. Wang, J. Kelly, A. Afonso, L. James, P. Kirschmeier, A. Mc Phail, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6, 195–200.
- [237] A. Peyroche, A. Antonny, S. Robineau, J. Acker, J. Cherfils, C. L. Jackson, *Mol. Cell* **1999**, 3, 275–285.
- [238] P. Chardin, F. McCormick, *Cell* **1999**, 97, 153–155.
- [239] T. Zor, M. Baryaacov, S. Elgavish, B. Shaanan, Z. Selinger, *Eur. J. Biochem.* **1997**, 249, 330–336.
- [240] T. Zor, R. Andorn, I. Sofer, M. Chorev, Z. Selinger, *FEBS Lett.* **1998**, 433, 326–330.
- [241] M. R. Ahmadian, T. Zor, D. Vogt, W. Kabsch, Z. Selinger, A. Wittinghofer, K. Scheffzek, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 7065–7070.
- [242] D. Barnard, B. Diaz, L. Hettich, E. Chuang, X. Zhang, J. Avruch, M. Marshall, *Oncogene* **1995**, 10, 1283–1290.
- [243] D. Barnard, H. Sun, L. Batur, M. S. Marshall, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, 247, 176–180.
- [244] M. Ohmiski, Y. Yamawaki-Kataoka, K. Kariya, M. Tamada, C.-D. Hu, T. Katarka, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 10210–10215.
- [245] T. Clackson, J. A. Wells, *Science* **1995**, 267, 383–386.
- [246] G. Schreiber, A. R. Fersht, *Biochemistry* **1993**, 32, 11195–11202.
- [247] C. L. Lo, C. Chothia, J. Janin, *J. Mol. Biol.* **1999**, 285, 2177–2198.
- [248] C. Herrmann, C. Block, C. Geisen, K. Haas, C. Weber, G. Winde, T. Moroy, O. Muller, *Oncogene* **1998**, 17, 1769–1776.
- [249] P. J. Pasricha, R. Pai, W. J. Ravich, T. R. Hendrix, A. N. Kalloo, *Gastroenterology* **1995**, 109, 994–998.
- [250] G. Winde, K. W. Schmid, W. Schlegel, R. Fischer, H. Osswald, H. Bunte, *Disc. Col. Rect.* **1995**, 38, 813–830.
- [251] H. J. Thompson, C. Jiang, J. Lu, R. G. Mehta, G. A. Piazza, N. S. Paranka, R. Pauku, D. J. Ahnen, *Cancer Res.* **1997**, 57, 267–271.
- [252] A. Gilbert, M. Sha, S. T. Wathen, N. R. R. Rando, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, 5, 1115–1122.
- [253] L. Long, R. Liu, R. Sherlock, M. H. Wigler, H. P. Nestler, *Chem. Biol.* **1999**, 6, 133–141.
- [254] G. Sewab, C. Chavany, I. Duroux, G. Goubin, J. Lebean, C. Hélène, T. Saison-Behmouras, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, 91, 10460–10464.