

Photoaktivierbare, synthetische Ras-Proteine als „Köder“ für die Identifizierung Plasmamembran-assoziiierter Bindungspartner des Ras-Proteins**

Jürgen Kuhlmann,* Andreas Tebbe, Martin Völkert, Melanie Wagner, Koji Uwai und Herbert Waldmann*

Die Regulation von Wachstums- und Differenzierungsprozessen durch die Proteine der Ras-Superfamilie^[1] ist unabhängig mit der korrekten subzellulären Verteilung dieser kleinen Guanosintriphosphat(GTP)-Bindungsproteine verknüpft.^[2] Die Ras-Proteine selbst können ihre biologische Funktion nur dann wahrnehmen, wenn sie an der Plasmamembran der Zelle lokalisiert sind. Die Voraussetzung für die erfolgreiche Adressierung bilden dabei posttranslationale Modifizierungen der Ras-Proteine wie S-Farnesylierung und S-Palmitoylierung am C-Terminus der Peptidkette.^[3]

Der Mechanismus dieser Translokation ist nach wie vor Gegenstand intensiver Diskussionen. So wird für die Isoform K-Ras^B das Modell einer unspezifischen, extrem negativ geladenen „anionischen Bindungsstelle“ postuliert, die sich zumindest teilweise aus Elementen der Lipiddoppelschicht zusammensetzt. Die Wechselwirkung mit der Plasmamembran erfolgt über einen Farnesylthioether sowie über ein polykationisches Element aus sechs Lysinresten, welche sich beide am C-Terminus des Proteins befinden.^[4] Die beiden Isoformen H- und N-Ras werden zusätzlich zur S-Farnesylierung an einem oder zwei weiteren C-terminalen Cysteinresten S-palmitoyliert. Auf diesen Schritt baut das Modell der Membranfalle^[5] auf: Eine für diese Reaktion notwendige prenylproteinspezifische Palmitoyltransferase (PTase) ist spezifisch in der Plasmamembran lokalisiert und verstärkt mit der zweiten hydrophoben Modifizierung des zuvor nur isoprenylierten Ras-Proteins die ursprünglich reversible Membranbindung erheblich, sodass ein Verlassen der Zielmembran ohne vorherige Hydrolyse des Fettsäurerests nahezu unmöglich ist. Diesen Modellen stehen experimentelle Daten entgegen, die auf unterschiedlichen Transportwegen

für K-Ras auf der einen und H- oder N-Ras auf der anderen Seite an die Plasmamembran hinweisen. Für H- und N-Ras wird dabei eine Palmitoylierung bereits im endoplasmatischen Retikulum postuliert.^[6]

Gegenwärtig fokussiert sich ein Teil des Interesses auf Querverbindungen zwischen Vorgängen der Signaltransduktion und der Subkompartimentierung der Plasmamembran.^[7] So ist H-Ras in Membrandomänen angereichert, die erhöhte Anteile an Sphingolipiden und Cholesterin aufweisen und als detergentenresistente „Flöße“ in der Lipiddoppelschicht schwimmen,^[8] während K-Ras nach dem Zufallsprinzip in der Plasmamembran verteilt ist.^[6]

Zur Aufklärung der Mechanismen der Ras-Lokalisation und für die Identifizierung potentieller Bindungspartner von Ras in der Plasmamembran sind geeignete Methoden notwendig, die über die bislang verfügbaren molekularbiologischen Methoden deutlich hinausgehen. Vor diesem Hintergrund haben wir Ras-Lipopeptide und -proteine synthetisiert, die eine photoaktivierbare Isoprenylthioethereinheit anstelle der Farnesylfunktion haben. Unsere Arbeiten belegen, dass diese Lipopeptide geeignete „Köder“ für die kovalente Markierung von Proteinen sind, während die Proteinkuppelungsprodukte nach wie vor die notwendige biologische Aktivität aufweisen, um spezifisch Ras-Bindungspartner zu erkennen.

Um als Abfangreagens für die kovalente Kupplung und Identifizierung noch unbekannter membranständiger Bindungspartner von Ras-Proteinen zu fungieren, mussten die hierfür vorgesehenen Lipopeptide eine Reihe von Anforderungen erfüllen:

1. Sie sollten die charakteristische C-terminale Aminosäuresequenz der jeweiligen Ras-Proteine aufweisen, die mit der Plasmamembran und vermutlich auch den gesuchten Bindungspartnern in Kontakt stehen. Hierfür wählten wir ein Heptapeptid mit der C-terminalen Sequenz von N-Ras, die mit einem S-farnesylierten Cysteinmethylester endet.^[9]
2. Die entsprechenden Peptide sollten selektiv und mit hoher Stabilität aus dem Cytosol in die Plasmamembran der Zielzelle insertieren. Dies wurde über die Einführung eines freien Cysteinrests erreicht, der in gleicher Position im kompletten N-Ras-Protein palmitoyliert wird. Die Thiofunktion wurde als *tert*-Butyldisulfid geschützt und konnte leicht durch Behandlung mit Dithiothreitol wieder reaktiviert werden. Für die resultierende Cystein-Thiofunktion konnte in analogen Konjugaten eine Palmitoylierung durch den zellulären „Syntheseapparat“ nachgewiesen werden. Dabei wurden S-palmitoylierte und S-farnesylierte Ras-Peptide gebildet, die sich selektiv in die Plasmamembran einlagerten.^[10, 11]
3. Die Konjugate sollten weiterhin eine photoaktivierbare^[12] funktionelle Gruppe enthalten, die vorzugsweise in die membranständige Isoprenylgruppe zu integrieren war. Zu diesem Zweck wurde ein Benzophenonbaustein (BP) als etablierter Photophor eingeführt.^[13, 14]
4. Für die Detektion und Reinigung der kovalent verknüpften Produkte nach der Photoaktivierung sollte ein Marker in das Lipopeptid integriert sein, der mit Standardmethoden leicht nachgewiesen werden kann. Hierfür wurde Biotin eingesetzt, da es als Marker für die notwendigen

[*] Dr. J. Kuhlmann, Dipl.-Biochem. A. Tebbe,
Dipl.-Biochem. M. Wagner
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie
Abteilung Strukturelle Biologie
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Germany)
Fax: (+49) 231-133-1435
E-mail: juergen.kuhlmann@mpi-dortmund.mpg.de

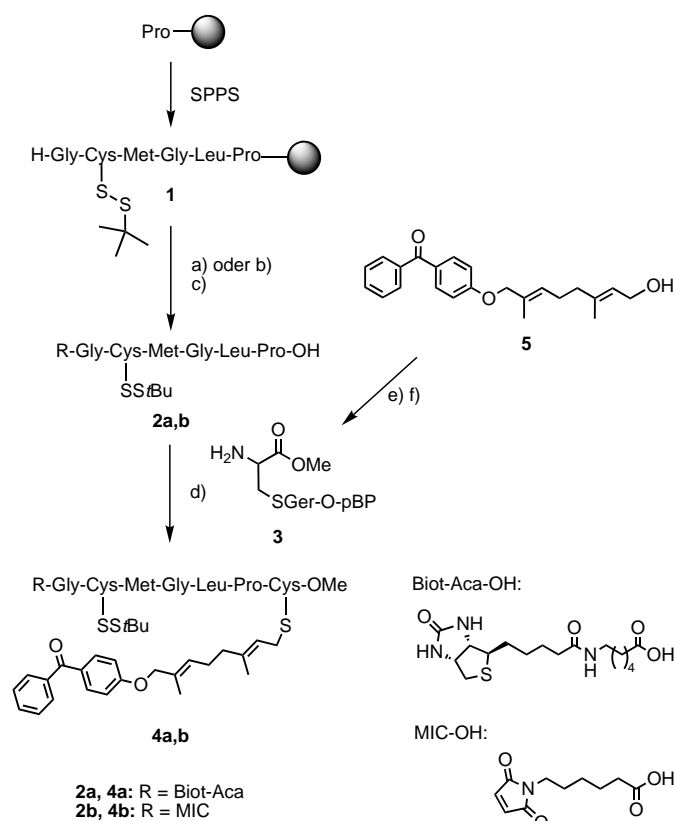
Prof. Dr. H. Waldmann, Dipl.-Chem. M. Völkert, Dr. K. Uwai
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie
Abteilung Chemische Biologie
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)
Fax: (+49) 231-133-2499
und
Universität Dortmund
Fb. 3, Organische Chemie
Otto-Hahn-Straße 6, 44227 Dortmund (Deutschland)
E-mail: herbert.waldmann@mpi-dortmund.mpg.de

[**] Wir danken Christine Nowak für exzellente technische Assistenz, Lilianna Wielitzek für Hilfestellung beim Einsatz des UV-Belichtungssystems sowie Fred Wittinghofer für fortlaufende Unterstützung. Die Arbeit wurde durch den Fonds der Chemischen Industrie und die Alexander-von-Humboldt-Stiftung gefördert.

Anreicherungs-schritte und auch für die Detektion bekannt ist.

5. Die Synthesestrategie sollte sowohl die Herstellung von photoaktivierbaren Lipopeptiden für die eigentlichen Markierungsexperimente als auch die Herstellung von Protein-Lipopeptid-Konjugaten ermöglichen, mit denen die biologische Aktivität der Lipopeptide überprüft werden kann. Hierfür wurde eine Funktionalisierung mit Maleinimidocapronsäure (MIC) durchgeführt, damit das Lipopeptid an ein C-terminales Cystein entsprechend verkürzter Ras-Proteine gekuppelt werden konnte.^[15, 16] Bei Verwendung onkogener Ras-Mutanten lässt sich so in einem zellulären Testsystem überprüfen, ob die Konjugate tatsächlich selektiv an die Plasmamembran gebunden werden und der Photophor die Bindung möglicher Interaktionspartner nicht nennenswert beeinflusst.

Erfüllt werden die oben aufgeführten Kriterien durch die Peptide **4a** und **4b**, deren Synthese in Schema 1 gezeigt ist. Zunächst wurde das N-terminale Hexapeptid der Ras-Sequenz mit hoher Effizienz in einer Festphasensynthese



Schema 1. Festphasensynthese der Hexapeptide **2a/b** und Kupplung der Fragmente mit dem BP-markierten, isoprenylierten Cystein **3**. a) Biot-Aca-OH, HBTU, HOBT, DIPEA, DMF; b) MIC-OH, HBTU, HOBT, DIPEA, DMF; c) 10 % TFA in CH_2Cl_2 , **2a**: 62 %, **2b**: 33 %; d) **3**: EDCI, HOBT, CH_2Cl_2 , **4a**: 43 %, **4b**: 55 %; e) NCS, DMS, CH_2Cl_2 ; f) CysOMe · HCl, NH_3 , MeOH, 66 % (2 Schritte). BP = Benzophenon, SPPS = Festphasenpeptidsynthese, HBTU = 2-(1-H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat, HOBT = 1-Hydroxybenzotriazol, DIPEA = Diisopropylethylamin, DMF = Dimethylformamid, DMS = Dimethylsulfid, EDCI = 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid, NCS = *N*-Chlorsuccinimid.

hergestellt, wobei die Anknüpfung an das Trägerpolymer über einen 2-Chlortriphenylmethyl(trityl)-Anker erfolgte. Für die Kettenverlängerung kamen dann Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)-geschützte Aminosäuren zum Einsatz. Anschließend wurde das Hexapeptid N-terminal entschützt und entweder Biotinaminocapronsäure (Biot-Aca-OH) oder Maleinimidocapronsäure (MIC-OH) an die Aminofunktion gekuppelt, ehe die Biot-Aca- oder MIC-markierten Peptide **2a** und **2b** vom Träger abgespalten wurden.

Beide Verbindungen wurden mit hoher Ausbeute isoliert und anschließend mit dem S-alkylierten Cystein-Methylester **3** zu den beiden Zielpeptiden **4a** und **4b** umgesetzt. Zuvor war bei **3** die terminale Isopreneinheit durch einen Benzophenon-Photophor ersetzt worden, der dem natürlichen Farnesylrest in Größe und Lipophilie weitestgehend entspricht. Der lipidmodifizierte und benzophenonmarkierte Cysteinmethylester **3** wurde durch Überführung des Allylkohols **5**^[17] in das entsprechende Allylchlorid und nachfolgende nucleophile Substitution mit Cysteinmethylester hergestellt.

Diese Synthesestrategie ist effizient und flexibel. Die Kombination aus Festphasensynthese und Synthese in Lösung sowie die Herstellung der Zielpeptide aus leicht variierten Bausteinen öffnet einen breiten Zugang zu weiteren analogen Verbindungen, die leicht an die jeweiligen Anforderungen der biologischen Testsysteme angepasst werden können. Dies gilt in gleichem Maße für die Variation der Photophorgruppe.

Um abschätzen zu können, ob die isoprenylierte Benzophenoneinheit für die Umsetzung mit Ras-Interaktionspartnern geeignet ist, führten wir Belichtungsexperimente unter Einsatz einer 1.6 μM wässrigen Pufferlösung (20 mM HEPES, pH 7.4, 5 mM MgCl_2) des Lipopeptids **4a** und 8 μM Rindersealbumin (BSA) durch. Die Reaktionslösungen wurden mit UV-Licht bestrahlt. Nach 5, 15, 30 und 60 min wurden Proben entnommen. Die Analyse der Produkte erfolgte durch denaturierende Gelelektrophorese in Acrylamidgelen (SDS-PAGE) und nachfolgenden Western-Blot. Biotinyliertes BSA wurde durch eine enzymatisch katalysierte Farbreaktion unter Verwendung von Streptavidin nachgewiesen, welches mit alkalischer Phosphatase konjugiert war. Die Benzophenoneinheit erwies sich in Abwesenheit von UV-Strahlung als stabil, während Belichtung mit Wellenlängen von 300–400 nm zu einer raschen Photoaktivierung und Kupplung des Lipopeptids an BSA führten (Abbildung 1). Hierbei

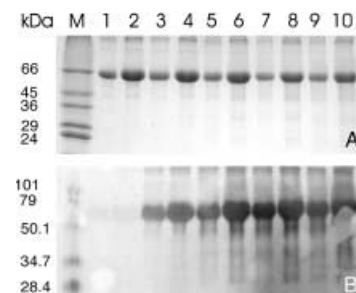


Abbildung 1. Umsetzung des biotinylierten Lipopeptids mit Rindersealbumin (BSA). Eine Lösung von 10 μM Lipopeptid **4a** wurde mit einem fünffachen Überschuss an BSA UV-belichtet und Proben vor (1,2) sowie 5 min (3,4), 15 min (5,6), 30 min (7, 8) und 60 min (9, 10) nach Beginn der Exposition entnommen. Für SDS-PAGE (A) und Western-Blot (B) wurden Aliquote mit 3 μg (1, 3, 5, 7, 9) oder 5 μg (2, 4, 6, 8, 10) BSA aufgetragen.

waren fünf Minuten UV-Belichtung ausreichend, um eine maximale Biotinylierung der BSA Probe zu erzielen.

Eine erfolgreiche Verwendung von Lipopeptiden mit der isoprenylierten Benzophenoneinheit zur Affinitätsmarkierung von Ras-Interaktionspartnern setzt voraus, dass die Substitution der Farnesylgruppe mit der derivatisierten Benzophenongruppe nicht die Erkennung der Lipopeptide durch Rezeptoren oder modifizierende Enzyme für Ras unterbindet. Wir stellten daher ein entsprechendes Lipoprotein durch

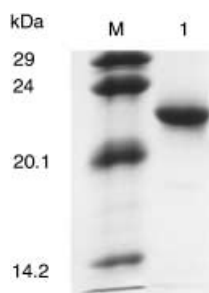


Abbildung 2. Charakterisierung der Kupplungsprodukte aus N-RasG12VΔ181 und dem Lipopeptid **4a** durch SDS-PAGE. Nach der SDS-PAGE-Analyse des Produkts hat eine Proteinbande ein scheinbares Molekulargewicht von 22 kDa mit einer Reinheit von >90 %.

Kupplung des Lipopeptids **4b** mit der C-terminal verkürzten, onkogenen N-Ras-Mutante N-RasG12VΔ181 her, welches den C-Terminus des natürlichen N-Ras-Proteins mit einer freien Palmitoylierungsstelle und einer Geranylbenzophenongruppe anstelle des Farnesylrests an der letzten Aminosäure aufwies (Schema 1). Die Reaktion der MIC-Gruppe des Lipopeptids erfolgte dabei fast quantitativ mit dem freien Cystein an Position 181 der N-Ras-Mutante.

N-RasG12VΔ181 endet mit einem freien Cystein, das selektiv mit der MIC-Gruppe reagiert. Das Kupplungsprodukt wurde unter Verwendung von Triton-X114 aus dem Reaktionsansatz extrahiert und über Ionenaustausch-Chromatographie gereinigt. Die denaturierende Gelelektrophorese liefert eine einzelne Bande für das hydrophobe Protein (Abbildung 2).

Diese setzt sich laut massenspektrometrischer Analyse (Abbildung 3) aus dem Kupplungsprodukt ohne die *S*-tert-Butyl-

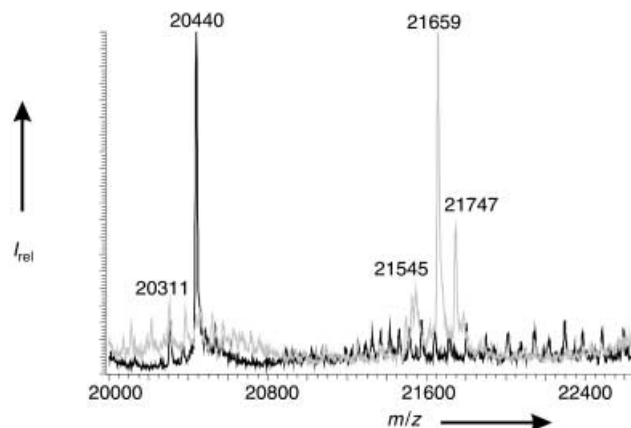


Abbildung 3. Charakterisierung der Kupplungsprodukte aus N-RasG12VΔ181 und dem Lipopeptid **4a** durch Massenspektrometrie. ESI-Massenspektrum von N-RasG12VΔ181 (schwarze Spur) und dem Kupplungsprodukt mit Lipopeptid **4a** (graue Spur). Das Basissignal im Eduktspektrum entspricht der theoretischen Masse des C-terminal verkürzten N-RasG12VΔ181-Proteins (20440 Da). Das kleinere Signal bei 20311 Da kann einem N-RasG12VΔ181-Protein ohne N-terminales Met 1 (theoretische Masse: 20309 Da) zugeordnet werden. Das Massenspektrum des Kupplungsprodukts zeigt das Basissignal bei 21659 und ein schwächeres Signal bei 21747 Da. Diese entsprechen dem erwarteten Kupplungsprodukt aus N-RasG12VΔ181 und **4a** nach und vor Entfernung der *S*-tert-Butyl-Schutzgruppe. Met 1 = Methionin 1.

Schutzgruppe am palmitoylierbaren Cystein (N-RasG12V^{CysGerBP}, 21659 Da) sowie dem Kupplungsprodukt mit Schutzgruppe (Signal schwächerer Intensität bei 21747 Da) zusammen. Die Daten bestätigen ein Verhältnis von 1:1 für das Protein-Lipopeptid-Kupplungsprodukt. Die spezifische Reaktion des MIC-Lipopeptids **4b** mit dem C-terminalen Cystein (Cys 181) von N-RasG12VΔ181 wurde durch Verdau des gekuppelten Proteins mit Trypsin und Chymotrypsin verifiziert. Aus den Ergebnissen der ESI-MS- und MALDI-TOF-MS-Untersuchungen der Proteolyseprodukte kann die Bildung von Lipopeptid-Thioethern mit den Cysteinen 51, 80 und 118 des N-RasG12VΔ181-Proteins ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

Die Phäochromocytom-Zelllinie PC12 kann durch onkogene Ras-Mutanten zur Differenzierung gebracht werden^[18] und bewirkt dabei eine erhebliche Änderung der Zellmorphologie. In dem hierbei eingesetzten Mikroinjektions-Assay korreliert das transformierende Potential der Ras-Mutanten mit der Effizienz der Differenzierung.^[19] Um sicherzustellen, dass die Benzophenon-Lipopeptide tatsächlich als Photoaffinitätsmarker zur Identifizierung von Ras-Rezeptoren und -Modifikatoren geeignet sind, ermittelten wir das Differenzierungspotential des onkogenen Kupplungsprodukts aus N-RasG12VΔ181 und dem Benzophenon-Lipopeptid **4b**. Dessen Effizienz stellten wir der des N-RasG12V-Proteins (volle Länge) sowie der des „natürlichen“ Kupplungsprodukts mit dem C-terminalen Farnesyl-Thioether (N-RasG12V^{CysFar}) gegenüber. In der Tat induzierte auch das Lipoprotein mit der isoprenylierten Benzophenongruppe die Bildung neuritartiger Ausläufer in den PC12-Zellen (Abbildung 4) und zeigte damit biologische Aktivität des Kupplungsprodukts an. Hieraus kann abgeleitet werden, dass ein Geranylbenzophenon-Thioether und eine Carboxymethylierung am C-Terminus ausreichen, um das onkogene Protein an seinen Wirkort zu adressieren. Dies schließt auch die Palmitoylierung des freien Cysteins in der Lipopeptidstruktur ein.

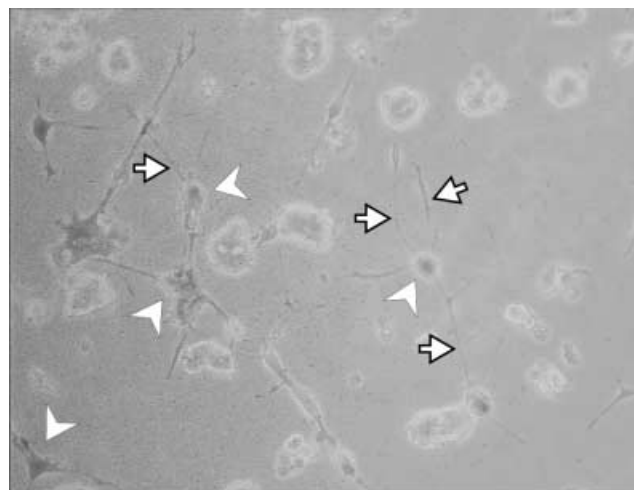


Abbildung 4. Differenzierung von PC12-Zellen durch N-RasG12V^{CysGerBP}. Überlagerung der Phasenkontrast- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme von PC12-Zellen nach Koinjektion von 100 μm onkogenem Ras-Konjugat und FITC-Dextran. Nur Zellen mit Fluoreszenzmarker (dunkler Zellkörper, weiße Pfeilspitzen) haben neuritartige Ausläufer gebildet (schwarz umrahmte Pfeile). FITC = Fluoresceinisothiocyanat.

Eine quantitative Analyse zeigte, dass das Potential der Benzophenonderivate zur Induktion des Neuritwachstums etwa ein Drittel des Potentials des N-RasG12V-Proteins (volle Länge) oder N-RasG12V^{CysFar}-Kupplungsprodukts aufweist (Abbildung 5). Diese Aktivität ist nach unserer Einschätzung bereits ausreichend, um erfolgreich biologische Experimente einschließlich Photoaktivierungsuntersuchungen durchzuführen.

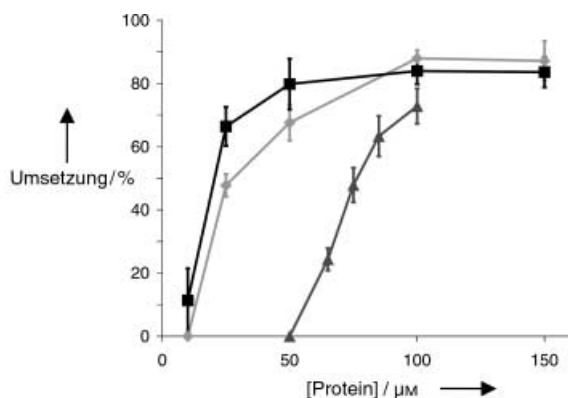


Abbildung 5. Differenzierungseffizienz onkogener N-Ras-Kupplungsprodukte. Die PC12-Zellen wurden mit Proteinlösungen behandelt, welche die angegebenen Konzentrationen von N-RasG12V^{CysGerBP} (▲), N-RasG12V^{CysFar} (◆) oder N-RasG12V (volle Länge) (■) aufwiesen. Die Differenzierung wurde anhand der Bildung neuritartiger Ausläufer ermittelt.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Einführung einer Benzophenongruppe als photoaktivierbarer Ligand in die Isoprenoideinheit von Ras-Lipopeptiden nicht die Fähigkeit der korrespondierenden onkogenen Ras-Lipoproteine zur Differenzierung von PC12-Zellen aufhebt. Darüber hinaus kann die photochemische Aktivierung des Benzophenons durch Belichtung bei 350–360 nm im nahen UV-Bereich erfolgen, womit nur eine geringe Photoschädigung weiterer biologischer Bausteine der behandelten Zellen verbunden ist. Wir halten daher „Sonden“ wie das Lipopeptid **4a** mit der C-terminalen Sequenz des Ras-Proteins, einer Benzophenon-Isoprenoid-Substitution der Farnesylgruppe und einem geeigneten Affinitätsmarker (z. B. Biotin) für vielversprechende „Werkzeuge“ zur Isolierung von Ras-modifizierenden Enzymen und Ras-Interaktionspartnern – insbesondere in Bezug auf Proteine, die in der Plasmamembran lokalisiert sind.

Untersuchungen mit GFP-Kupplungsprodukten (grün fluoreszierendes Protein) von Ras haben der Vorstellung Vorschub geleistet, dass der hydrophob modifizierte C-Terminus der Ras-Isoformen die Adressierung und Lokalisierung dieser Proteine festlegt,^[6, 20] während die eigentliche G-Domäne dabei nur eine untergeordnete Rolle spielt. Der C-Terminus von Ras ist flexibel und konnte bislang weder im kristallinen Protein^[21, 22] oder Komplex,^[23] noch durch NMR-Analysen des H-Ras-Proteins bestimmt werden.^[24] Daher ist es höchst wahrscheinlich, dass der Ras-C-Terminus für die Erkennung und Bindung möglicher Ras-Rezeptoren und -Modifikatoren durch Affinitätsmarker ausreichend ist.

Die Kombination von organischer Synthese und Zellbiologie ermöglicht den Zugang zu einer Vielzahl von Lipopeptiden und -proteinen als „Köder“ für Ras-Interaktionspart-

ner. So können verschiedene natürliche oder synthetische hydrophobe Modifizierungen, alternative Affinitätsmarker oder Radioisotopenmarkierungen eingebaut werden oder das Peptidrückgrat durch ein nichtpeptidisches ersetzt werden. Die hier beschriebene Verknüpfung von chemischer Synthese mit biochemischen und massenspektrometrischen Techniken sowie Zellkulturmethoden sollte geeignete Methoden liefern, mit denen die Klärung der aktuellen Fragestellungen zur Signaltransduktion durch Ras-Proteine angegangen werden kann.

Eingegangen am 7. Januar 2002 [Z18487]

- [1] L. Van Aelst, M. Barr, S. Marcus, A. Polverino, M. Wigler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 6213–6217.
- [2] A. Wittinghofer, *Biol. Chem.* **1998**, 379, 933–937.
- [3] A. Wittinghofer, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 4360–4383; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 4193–4214.
- [4] M. O. Roy, R. Leventis, J. R. Silvius, *Biochemistry* **2000**, 39, 8298–8307.
- [5] S. Shahanian, J. R. Silvius, *Biochemistry* **1995**, 34, 3813–3822.
- [6] A. Apolloni, I. A. Prior, M. Lindsay, R. G. Parton, J. F. Hancock, *Mol. Cell. Biol.* **2000**, 20, 2475–2487.
- [7] D. A. Brown, E. London, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 17221–17224.
- [8] S. Roy, R. Luetterforst, A. Harding, A. Apolloni, M. Etheridge, E. Stang, B. Rolls, J. F. Hancock, R. G. Parton, *Nat. Cell Biol.* **1999**, 1, 98–105.
- [9] J. F. Hancock, A. I. Magee, J. E. Childs, C. J. Marshall, *Cell* **1989**, 57, 1167–1177.
- [10] H. Waldmann, M. Schelhaas, E. Nagele, J. Kuhlmann, A. Wittinghofer, Schroeder, J. R. Silvius, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 2334–2337; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 2238–2241.
- [11] H. Schroeder, R. Leventis, S. Rex, M. Schelhaas, E. Nagele, H. Waldmann, J. R. Silvius, *Biochemistry* **1997**, 36, 13102–13109.
- [12] F. Kotzyba-Hibert, I. Kapfer, M. Goeldner, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 1391–1408; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 1296–1312.
- [13] T. A. Kale, C. Raab, N. Yu, D. E. Dean, M. D. Distefano, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 4373–4381.
- [14] G. Dorman, G. D. Prestwich, *Trends Biotechnol.* **2000**, 18, 64–77.
- [15] B. Bader, K. Kuhn, D. J. Owen, H. Waldmann, A. Wittinghofer, J. Kuhlmann, *Nature* **2000**, 403, 223–226.
- [16] K. Kuhn, D. J. Owen, B. Bader, A. Wittinghofer, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 1023–1035.
- [17] D. M. Marecak, Y. Horiuchi, H. Arai, M. Shimonaga, Y. Maki, T. Koyama, K. Ogura, G. D. Prestwich, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 1973–1978.
- [18] D. Bar-Sagi, J. R. Feramisco, *Cell* **1985**, 42, 841–848.
- [19] R. H. Cool, G. Schmidt, C. U. Lenzen, H. Prinz, D. Vogt, A. Wittinghofer, *Mol. Cell. Biol.* **1999**, 19, 6297–6305.
- [20] E. Choy, V. K. Chiu, J. Silletti, M. Feoktistov, T. Morimoto, D. Michaelson, I. E. Ivanov, M. R. Philips, *Cell* **1999**, 98, 69–80.
- [21] A. M. de Vos, L. Tong, M. V. Milburn, P. M. Matias, J. Jancarik, S. Noguchi, S. Nishimura, K. Miura, E. Ohtsuka, S. H. Kim, *Science* **1988**, 239, 888–893.
- [22] E. F. Pai, W. Kabsch, U. Krengel, K. C. Holmes, J. John, A. Wittinghofer, *Nature* **1989**, 341, 209–214.
- [23] K. Scheffzek, M. R. Ahmadian, W. Kabsch, L. Wiesmuller, A. Lautwein, F. Schmitz, A. Wittinghofer, *Science* **1997**, 277, 333–338.
- [24] K. Yamasaki, G. Kawai, Y. Ito, Y. Muto, J. Fujita, T. Miyazawa, S. Nishimura, S. Yokoyama, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, 162, 1054–1062.