

Die Lipidmodifikationen von Ras passen sich an die Membranumgebung an und beeinflussen die lokale Konzentration**

Alexander Vogel, Guido Reuther, Katrin Weise, Gemma Triola, Jörg Nikolaus, Kui-Thong Tan, Christine Nowak, Andreas Herrmann, Herbert Waldmann, Roland Winter und Daniel Huster*

Die Weiterleitung eines Signals vom Zelläußerem zum Zellkern ist einer der wichtigsten Mechanismen für die Regulierung zahlreicher biologischer Prozesse. Externe Signale aktivieren Rezeptoren, die die Informationen durch die Membran übertragen, wo sie durch Proteine weitergeleitet werden, die wiederum Ionenkanäle, Phosphokininasen oder andere Effektoren aktivieren. GTP-bindende Proteine, die das Signal am Rezeptor aufnehmen (wie heterotrimere G-Proteine oder Ras), sind durch posttranskriptionale Lipidmodifikationen in der Membran verankert.^[1] Da diese Lipidketten durch hydrophobe Wechselwirkungen maßgeblich zur Membranverankerung der Proteine beitragen, führt ihr Fehlen zur Ablösung des Moleküls von der Membran und damit zu seiner Deaktivierung. Deshalb erhöht Ras durch die Membranbindung seine effektive Konzentration, um die Wechselwirkung mit seinen Effektoren zu optimieren.^[2] Das Ras-Protein ist ein wichtiger molekularer Schalter, der die Proliferation sowie Zelldifferenzierung und -wachstum reguliert.^[3]

Die hohe Spezifität der Membranbindung von Ras wird bereits durch einen Vergleich der Mitglieder der Ras-Familie deutlich: N-Ras und K-Ras4A verfügen über je zwei Lipidmodifikationen, während H-Ras drei Lipidmodifikationen aufweist.^[4] Dagegen wird K-Ras4B durch die gleichzeitige Wirkung einer Lipidmodifikation und anziehender elektrostatischer Wechselwirkungen an die Membran gebunden.^[4]

Obwohl die Lipidmodifikationen in die Membran eingebettet sind, zeigen sie ein hohes Maß an Flexibilität, das auch in die Polypeptidkette übertragen wird.^[5,6]

Obwohl die hochgradig homologen Ras-Proteine *in vitro* mit denselben Effektoren wechselwirken, produzieren sie *in vivo* deutlich unterschiedliche Signale. Dies impliziert, dass die beobachteten Unterschiede auf die lipidmodifizierten C-Termini zurückzuführen sind, in denen die Homologie sehr niedrig ist.^[7] Außerdem scheint in Abhängigkeit von der Nucleotidbindung die Lokalisation von Ras in flüssigkristallinen Domänen oder Membran-Rafts^[8] reguliert zu werden. Während nur aktives H-Ras*GTP mit den entsprechenden Effektoren wechselwirkt, ist die inaktive Form H-Ras*GDP in Rafts lokalisiert, wo das Signal nicht weiterübertragen wird. Ein alternatives Modell führt die unterschiedlichen Signale der verschiedenen Ras-Isoformen auf Unterschiede in der Aufnahme- und Aufenthaltszeit in den verschiedenen Domänen zurück.^[9,10] Dies legt den Schluss nahe, dass die Membranlokalisierung und biologische Funktion auf den Wechselwirkungen des Ras-Proteins und seiner Lipidmodifikationen mit Rafts oder flüssigkristallinen Membrandomänen beruhen, was hier untersucht werden sollte.

Für die Untersuchung von Lipidketten ist die ²H-NMR-Spektroskopie äußerst nützlich. Dieses Verfahren ist auf die einzelnen Komponenten einer Lipidmischung anwendbar und erfordert nur die Synthese des jeweiligen Moleküls in deuterierter Form. Zuerst untersuchten wir die Anpassung der Lipidmodifikationen eines N-Ras-Heptaapeptids, das an den Aminosäuren Cys181 und Cys186 hexadecyliert war, an die Membrandicke. Es wurden vier verschiedene Membranmodelle bestehend aus Lipiden mit unterschiedlichen Kohlenwasserstoffketten ausgewählt. Die ²H-NMR-spektroskopisch bestimmte Membrandicke schwankte dabei zwischen 21.0 (DLPC) und 38.8 Å (DPPC/Cholesterin, 10:6; siehe Tabelle 1). Die hohe Cholesterinkonzentration führte dabei zur Kondensation der Lipide, wodurch sich ihre Kettenlänge erhöht^[11] und die Phasenübergänge von DPPC verschwinden, sodass alle Lipidmischungen bei 30°C studiert werden konnten.

²H-NMR-Spektren wurden sowohl für deuterierte Membranen mit oder ohne Ras aufgenommen als auch für deuteriertes [D₆₆]Ras in protonierten Membranen. Repräsentative ²H-NMR-Spektren für Ras in DLPC sind in Abbildung 1 a–c dargestellt. Die Einlagerung von Ras ändert die Ordnungsparameter der Membranlipide kaum, während das Signal im Spektrum der Ras-Lipidmodifikationen deutlich schmäler ist, was zu niedrigeren Ordnungsparametern führt.

Aus den Ordnungsparameterprofilen (Abbildung 1 d) wurden geometrische Parameter der Lipidketten der Wirt-

[*] Dr. G. Reuther, Prof. Dr. D. Huster
Institut für Medizinische Physik und Biophysik
Universität Leipzig
Härtelstraße 16–18, 04107 Leipzig (Deutschland)
Fax: (+49) 341-97-15709
E-Mail: daniel.huster@medizin.uni-leipzig.de

Dr. A. Vogel
Institut für Biochemie/Biotechnologie
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Kurt-Mothes-Straße 3, 06120 Halle (Deutschland)

Dr. G. Triola, Dr. K.-T. Tan, C. Nowak, Prof. Dr. H. Waldmann
Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)

Dr. K. Weise, Prof. Dr. R. Winter
Physikalische Chemie I, TU Dortmund
Otto-Hahn-Straße 6, 44227 Dortmund (Deutschland)

J. Nikolaus, Prof. Dr. A. Herrmann
Institut für Biologie/Biophysik
Humboldt-Universität zu Berlin
Invalidenstraße 42, 10115 Berlin (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde durch die DFG (SFB 610A14, VO 1523/1, SFB 642, und SFB 740) unterstützt.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200903396> zu finden.

Tabelle 1: Strukturparameter der Lipidmembranen und der Ras-Lipidmodifikationen bei 30 °C mit einem molaren Verhältnis von Lipid zu Peptid von 10:1.

Probe	A [Å ²] ^[a]	D _C [Å] ^[b]	L _C [Å] ^[c]
[D ₆₂]DPPC/Chol	22.7	38.8	16.2
[D ₆₂]DPPC/Chol/Ras	22.8	38.6	16.1
DPPC/Chol/[D ₆₆]Ras	23.6	37.2	15.5
[D ₃₁]POPC	30.8	28.6	11.6
[D ₃₁]POPC/Ras	30.6	28.8	11.6
POPC/[D ₆₆]Ras	33.3	26.4	10.0
[D ₅₄]DMPC	29.9	25.8	10.5
[D ₅₄]DMPC/Ras	29.2	26.4	10.7
DMPC/[D ₆₆]Ras	33.6	26.2	10.0
[D ₄₆]DLPC	31.5	21.0	8.2
[D ₄₆]DLPC/Ras	30.9	21.4	8.4
DLPC/[D ₆₆]Ras	35.4	24.8	8.7

[a] Querschnittsfläche einer Kohlenwasserstoffkette. [b] Hydrophobe Membrandicke. [c] Kettenausdehnung einer Kohlenwasserstoffkette.

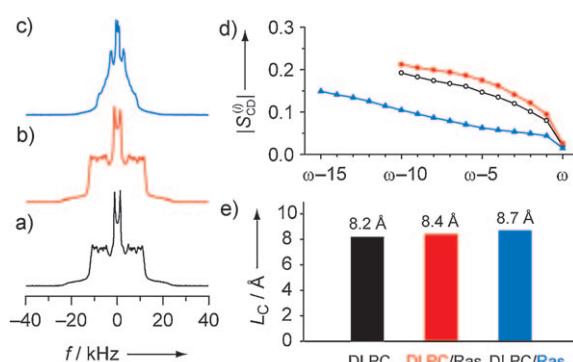


Abbildung 1. ²H-NMR-Spektren von deuteriertem DLPC (a), deuteriertem DLPC/Ras 10:1 (b) und deuteriertem [D₆₆]Ras in DLPC (c). d) Ordnungsparameter von DLPC ohne (schwarz) und mit Ras (rot) und Ras-Lipidmodifikationen (blau). e) Darstellung der Kettenlängen (L_C) von DLPC und Ras.

membran und des Ras-Proteins berechnet^[12] (Tabelle 1). Für DLPC wurde eine kleine Erhöhung der Kettenlänge in Gegenwart von Ras beobachtet (Abbildung 1e). Überraschenderweise zeigten die Ras-Lipidmodifikationen eine nahezu identische Länge, obwohl sie vier zusätzliche Methylengruppen enthielten. Somit wird eine nahezu perfekte Anpassung der Kettenlänge von Ras und DLPC beobachtet. Die 16:0-Ras-Ketten erreichen diese Anpassung an die 12:0-DLPC-Ketten durch eine Erhöhung der Querschnittsfläche auf 35.4 Å² pro Kette, während die Lauroylketten der Membran nur 30.9 Å² pro Kette einnehmen.

Als nächstes untersuchten wir, ob diese Kettenlängenanpassung auch in Membranen mit größeren hydrophoben Dicken stattfindet. Die entsprechenden ²H-NMR-Spektren und Ordnungsparameter für DMPC, POPC und DPPC/Cholesterin sind in den Hintergrundinformationen zu finden. Die daraus erhaltenen Kettenlängen sind in Abbildung 2 dargestellt. In allen Fällen wurde eine nahezu perfekte Kettenlängenanpassung zwischen Ras und der Membran beobachtet. Unter Berücksichtigung sämtlicher ²H-NMR-Daten kommen wir zu dem Schluss, dass sich die Länge der Ras-Lipidmodifikationen an die der umgebenden Lipide anpasst.

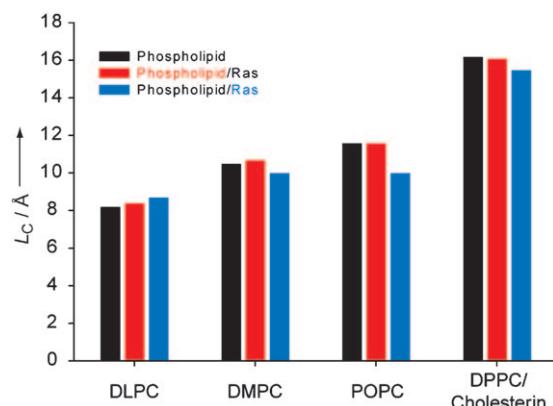


Abbildung 2. Kettenlängen der Phospholipide (schwarz und rot) und der Ras-Lipidmodifikationen (blau) in Membranen verschiedener Zusammensetzung (bei 30 °C).

In Abhängigkeit von der hydrophoben Dicke der umgebenden Membran wurden Ras-Kettenlängen zwischen 8.7 und 15.5 Å beobachtet, was bedeutet, dass die Lipidmodifikationen von Ras ihre Länge verdoppeln können, um sich an die umgebende Membran anzupassen. Dieser Prozess wird begleitet von einer Änderung der Querschnittsfläche zwischen 35.4 und 23.6 Å². Umgekehrt ändert sich die Dicke der Membran durch die Ras-Einlagerung kaum. Stattdessen passt sich die Länge der Ras-Lipidmodifikationen an, was den energetisch günstigeren Prozess darzustellen scheint. Dies unterscheidet sich von der Einlagerung starrer α -Helices, bei der sich die Membran anpasst, um den Unterschied der hydrophoben Dicke auszugleichen.^[13] Solche Prozesse betreffen viele Lipidmoleküle, wodurch sie sehr wahrscheinlich energetisch ungünstiger sind.

Die Anpassung der Ras-Lipidmodifikationen an die Wirtmembran erfordert entweder ihre Verlängerung oder Verkürzung. Die Kompression einer Lipidkette erhöht die Zahl ihrer *gauche*-Defekte, was sich auf die Kettenenthalpie und -entropie auswirkt.^[14] Ein einzelner *gauche*-Defekt ändert die Kettenlänge um 1.1 Å.^[15] Dies ermöglicht es, die Zahl der *gauche*-Defekte anhand der Kettenlängenanpassung abzuschätzen. Eine all-trans-Kette hat eine Kettenlänge von 17.8 Å (insgesamt 14 Bindungen zwischen protonierten Kohlenstoffen). Die ausgedehntesten Ras-Ketten wurden in DPPC/Cholesterin beobachtet (15.5 Å) und wiesen damit durchschnittlich zwei *gauche*-Defekte auf. Dagegen zeigen die Ketten in DLPC-Membranen nur eine Länge von 8.7 Å, was ungefähr acht *gauche*-Defekte voraussetzt.

Dieses aus physikochemischer Sicht interessante Phänomen sollte auch eine biologische Bedeutung haben. In der Zelle tauscht Ras sowohl zwischen den Plasma- und Golgi-Membranen als auch zwischen verschiedenen Domänen innerhalb der Plasmamembran aus. Zellstudien zeigten, dass die Lokalisation von Ras zum Teil durch die unterschiedlichen Lipidmodifikationen gesteuert wird.^[16,17] Der Lipidanker von N-Ras kontrolliert dabei die schnelle und reversible Verteilung der Moleküle über die verschiedenen Membranen.^[18]

Die Protein-Palmitoylierung wird als Signal zur Lokalisierung in Rafts betrachtet, und Ras könnte ebenfalls in Rafts

angereichert sein.^[19] Raft- („flüssig geordnet“, I_o) und Nicht-Raft-Domänen („flüssig ungeordnet“, I_d) zeichnen sich durch unterschiedliche Membrandicken aus.^[20–22] In den I_o -Domänen werden hauptsächlich Cholesterin und Sphingomyelin (SM) mit langen gesättigten Fettsäuren gefunden, während sich in den I_d -Domänen größtenteils ungesättigte Lipide befinden, die weniger geordnet und damit kürzer sind. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Ras-Proteine an die I_o - I_d -Phasengrenzen diffundieren und sich dort sammeln.^[10] Da in Computersimulationen eine Wechselwirkung zwischen der G-Domäne von H-Ras und Membranen beobachtet wurde,^[23] führten wir unsere Experimente an Raft-bildenden Membranen nicht mit dem Ras-Peptid, sondern mit dem vollständigen lipidmodifizierten Ras-Protein aus.^[24] Dieses vollkommen funktionale Konstrukt wies eine Hexadecylkette an Cys181 und eine Farnesylkette an Cys186 auf.

Zuerst untersuchten wir die laterale Verteilung von Ras in riesigen Plasmamembranvesikeln (GPMV) von HeLa-Zellen.^[25] Die I_d -Phase wurde mit dem rot fluoreszierenden R18 markiert. BODIPY-markiertes N-Ras (grüne Fluoreszenz) wird ausschließlich in dieser Domäne gefunden (Abbildung 3 a).

Da keine ausreichenden Mengen an GPMVs für NMR-Untersuchungen präpariert werden konnten, wurden Modellmembranen aus Hüllmembranen von Influenzaviren hergestellt, welche die Zusammensetzung einer biologischen Membran widerspiegeln. Kleine Mengen an deuterierten Lipiden wurden hinzugefügt, um die Untersuchung mit ^2H -NMR-Spektroskopie zu ermöglichen. Für diese Lipidmischung konnte mithilfe von konfokaler Fluoreszenzmikroskopie an riesigen unilamellaren Vesikeln (GUVs) sowie mit Rasterkraftmikroskopie (AFM) an auf einem festen Untergrund fixierten Membranen gezeigt werden, dass I_o - und I_d -Domänen über einen großen Temperaturbereich coexistieren (siehe Abbildung 3 b–d und die Hintergrundinformationen). In Übereinstimmung mit den Untersuchungen an GPMVs ist N-Ras auch in den I_d -Domänen der Virushüllmembranen lokalisiert. Außerdem zeigen sowohl Fluoreszenzmikroskopie als auch AFM, dass ein signifikanter Anteil von N-Ras an den I_o - I_d -Phasengrenzen lokalisiert ist (Abbildung 3 b–d), während der Marker für die I_d -Phase dort nicht zu finden ist.

Bei den ^2H -NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurden als Marker für die I_o - und I_d -Phase entweder 10 Mol-% deuteriertes Palmitoyl-Sphingomyelin (PSM) oder 10 Mol-% deuteriertes POPC hinzugegeben. Dadurch war entweder POPC, PSM oder N-Ras deuteriert, sodass jeweils charakteristische ^2H -NMR-Spektren aufgenommen werden konnten (Abbildung 4 a–c). Die ^2H -NMR-Spektren der beiden Lipide unterscheiden sich aufgrund der unterschiedlichen Umgebungen stark, während das Signal im Spektrum der N-Ras-Hexadecylkette deutlich schmäler ist, eine schlechte Auflösung zeigt und keinem der Lipidspektren ähnelt. Solche ^2H -NMR-Spektren sind ein Hinweis auf langsamere Bewegungen mit Korrelationszeiten im Mikrosekundenbereich, sehr ähnlich dem Verhalten von Lipiden mit signifikanten Fluktuationen am kritischen Punkt einer ternären Lipidmischung.^[26] Außerdem ist das Pake-Spektrum mit einem isotropen Signal überlagert, das etwa 8.5% der Intensität ausmacht. In biologischen Membranen werden solche

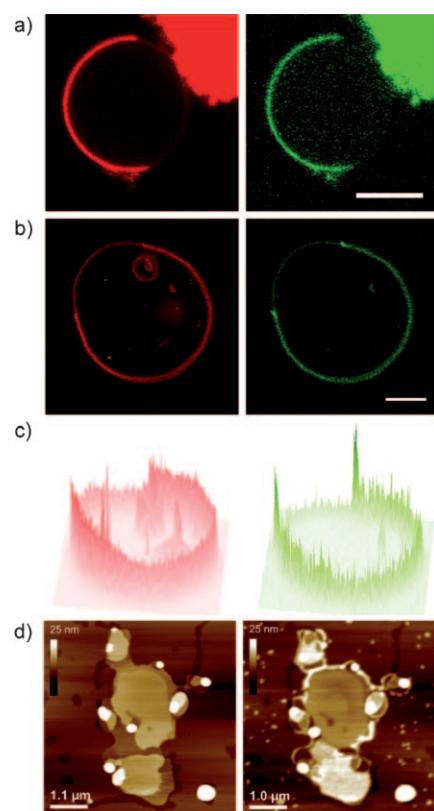


Abbildung 3. N-Ras-Lokalisation in I_d -Domänen. a) Konfokale Lasermikroskopie von GPMVs aus HeLa-Zellen; die Bilder zeigen laterale Lipiddichten bei 4°C. BODIPY-markiertes N-Ras-Protein (grüne Fluoreszenz) ist mit R18 (rote Fluoreszenz), das sich in I_d -Domänen anreichert, colokalisiert (Maßstab 5 µm). Die Fluoreszenz in der oberen rechten Ecke stammt von Zellrückständen. b) GUVs (hergestellt aus Influenzavirus-Membranen mit 10 Mol-% PSM, 10 Mol-% POPC und 1 Mol-% N-Rh-DOPE), die 24 h bei 20°C mit BODIPY-markiertem N-Ras inkubiert wurden, zeigen, dass das Ras-Protein bei 4°C in den I_d -Domänen und insbesondere an den I_o - I_d -Phasengrenzen lokalisiert ist. c) Fluoreszenzintensitätsprofile der Bilder aus (b) heben die bevorzugte Lokalisation von N-Ras (grüne Fluoreszenz) an den I_o - I_d -Phasengrenzen hervor. d) AFM-Bilder der Virusmembranen vor ($t = 0$ h, links) und nach ($t = 3.5$ h, rechts) Zugabe von N-Ras. Eine deutliche Anreicherung von N-Ras an den Domänengrenzen wird beobachtet.

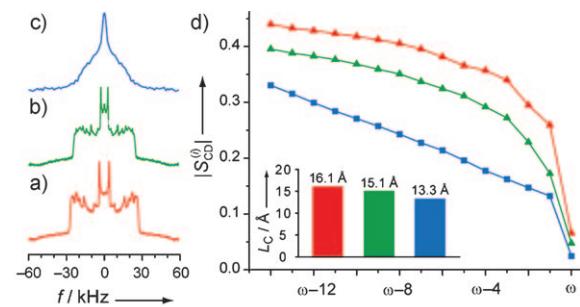


Abbildung 4. ^2H -NMR-Spektren von PSM (a), POPC (b) und dem vollständigen Ras-Protein (c) in Influenzavirus-Membranen bei 30°C. Die Virusmembranen enthielten 10 Mol-% POPC und PSM sowie 7 Mol-% Ras-Protein. d) Ordnungsparameterprofile der jeweiligen Lipide und der Ras-Lipidmodifikationen in den Virusmembranen. Das Balkendiagramm zeigt die Kettenlängen von PSM (rot), POPC (grün) und Ras (blau).

Phänomene häufig beobachtet; sie können durch hoch bewegliche Lipidketten erklärt werden.^[27] Dies legt den Schluss nahe, dass sich ungefähr 8.5% der Ras-Lipidmodifikationen isotrop bewegen und wahrscheinlich nicht in die Membran eingelagert sind.

Die Ordnungsparameterprofile von den Phospholipiden und N-Ras in der Mischung sind in Abbildung 4d dargestellt. In Übereinstimmung mit beobachteten Unterschieden zwischen l_o - und l_d -Domänen^[20–22] sind die Ordnungsparameter von PSM höher als die von POPC, obwohl die daraus folgenden Kettenlängen recht ähnlich sind (15.1 Å für POPC und 16.1 Å für PSM). Die Lipidmodifikationen von N-Ras zeigen dagegen eine niedrigere Ordnung, die in einer kürzeren Kettenlänge von 13.3 Å resultiert – ein Hinweis darauf, dass N-Ras hauptsächlich von flüssigkristallinen Lipiden umgeben ist.

Raft- und l_d -Domänen der Plasmamembran unterscheiden sich nicht nur in ihrer Lipidzusammensetzung, sondern auch in ihren biophysikalischen Eigenschaften. Dies hat einen starken Einfluss auf die hydrophobe Dicke der einzelnen Domänen, die wiederum die Lipidmodifikationen von N-Ras beeinflusst. In Anbetracht der beobachteten Anpassung der Ras-Lipidmodifikationen an die Dicke der Wirtmembran folgt, dass Ras bei lateraler Diffusion in oder aus einem Raft bedeutende Änderungen in Struktur und Dynamik erfährt. In den Membranen, die aus Influenzaviren präpariert wurden, konnte mithilfe von Markerlipiden (POPC für die l_d - und PSM für die l_o -Phase) ein Unterschied in der Dicke der Domänen gezeigt werden. Darüber hinaus ist die N-Ras-Lipidmodifikation ungeordnet und weist eine Länge von 13.3 Å auf, was ca. vier *gauche*-Defekten entspricht. Diese Kettenlänge ist größer als in reinen DLPC-, DMPC- oder POPC-Membranen, aber kleiner als die von POPC in Virusmembranen, das den Marker für die l_d -Phase darstellt. Dies spricht stark dafür, dass sich N-Ras in den l_d -Domänen aufhält. Weiterhin liefern die ^2H -NMR-Spektren Hinweise auf Bewegungen auf einer intermediären Zeitskala, die auf langlebige Fluktuationen korrelierter N-Ras-Moleküle auf der Submikrometerskala hindeuten. Diese Eigenschaften sind im Einklang mit einer Absonderung von N-Ras an die l_o - l_d -Phasengrenze, wo es zu einer energetisch günstigen Senkung der Linienspannung an der entmischten Phase kommt, wie durch Fluoreszenzmikroskopie und AFM am viralen Membransystem gezeigt werden konnte. Die Lokalisation von Ras an der Phasengrenze kann dabei zu einer schnelleren und flexibleren Umverteilung der Moleküle zwischen den einzelnen Domänen führen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich die Lipidmodifikationen des membrangebundenen N-Ras-Proteins erstaunlich gut an die hydrophobe Dicke der Wirtmembran anpassen. Eine gesättigte 16:0-Kette von N-Ras kann ihre Länge durch Einbau von bis zu sechs weiteren *gauche*-Defekten halbieren. In Abhängigkeit von der Wirtmembran weisen die Lipidmodifikationen hohe Bewegungsamplituden auf und sind generell sehr flexibel. Somit nehmen wir an, dass die Anpassung an die Eigenschaften der Wirtmembran eine Grundvoraussetzung für den Austausch des

Proteins zwischen verschiedenen Membranen und Domänen darstellt.

Eingegangen am 23. Juni 2009
Online veröffentlicht am 14. Oktober 2009

Stichwörter: Fluoreszenzmikroskopie · ^2H -NMR-Spektroskopie · Lipidmodifikationen · Lipid-Rafts · Rastersondenverfahren

- [1] P. J. Casey, *Science* **1995**, *268*, 221–225.
- [2] D. Murray, N. Ben-Tal, B. Honig, S. McLaughlin, *Structure* **1997**, *5*, 985–989.
- [3] L. Brunsved, J. Kuhlmann, K. Alexandrov, A. Wittinghofer, R. S. Goody, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 6774–6798; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6622–6646.
- [4] a) A. J. Laude, I. A. Prior, *J. Cell Sci.* **2008**, *121*, 421–427; b) L. Brunsved, H. Waldmann, D. Huster, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2009**, *1788*, 273–288.
- [5] A. Vogel, C. P. Katzka, H. Waldmann, K. Arnold, M. F. Brown, D. Huster, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12263–12272.
- [6] G. Reuther, K.-T. Tan, A. Vogel, C. Nowak, J. Kuhlmann, H. Waldmann, D. Huster, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13840–13846.
- [7] R. G. Parton, J. F. Hancock, *Trends Cell Biol.* **2004**, *14*, 141–147.
- [8] K. Simons, E. Ikonen, *Nature* **1997**, *387*, 569–572.
- [9] A. Peyker, O. Rocks, P. I. H. Bastiaens, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 78–85.
- [10] K. Weise, G. Triola, L. Brunsved, H. Waldmann, R. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1557–1564.
- [11] H. A. Scheidt, D. Huster, K. Gawrisch, *Biophys. J.* **2005**, *89*, 2504–2512.
- [12] H. I. Petrache, S. W. Dodd, M. F. Brown, *Biophys. J.* **2000**, *79*, 3172–3192.
- [13] M. R. de Planque, J. A. Killian, *Mol. Membr. Biol.* **2003**, *20*, 271–284.
- [14] J. P. Douliez, A. Leonard, E. J. Dufourc, *Biophys. J.* **1995**, *68*, 1727–1739.
- [15] S. E. Feller, K. Gawrisch, A. D. MacKerell, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 318–326.
- [16] S. Eisenberg, Y. I. Henis, *Cell. Signalling* **2008**, *20*, 31–39.
- [17] J. Omerovic, A. J. Laude, I. A. Prior, *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 2575–2589.
- [18] O. Rocks, A. Peyker, M. Kahms, P. J. Verveer, C. Koerner, M. Lumbierres, J. Kuhlmann, H. Waldmann, A. Wittinghofer, P. I. H. Bastiaens, *Science* **2005**, *307*, 1746–1752.
- [19] S. J. Plowman, J. F. Hancock, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2005**, *1746*, 274–283.
- [20] T. Bartels, R. S. Lankalapalli, R. Bittman, K. Beyer, M. F. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14521–14532.
- [21] A. Bunge, P. Müller, M. Stöckl, A. Herrmann, D. Huster, *Biophys. J.* **2008**, *94*, 2680–2690.
- [22] T. C. McIntosh, *Methods Mol. Biol.* **2007**, *398*, 221–230.
- [23] A. A. Gorfe, M. Hanzal-Bayer, D. Abankwa, J. F. Hancock, J. A. McCammon, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 674–684.
- [24] B. Bader, K. Kuhn, D. J. Owen, H. Waldmann, A. Wittinghofer, J. Kuhlmann, *Nature* **2000**, *403*, 223–226.
- [25] T. Baumgart, A. T. Hammond, P. Sengupta, S. T. Hess, D. A. Holowka, B. A. Baird, W. W. Webb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 3165–3170.
- [26] S. L. Veatch, O. Soubias, S. L. Keller, K. Gawrisch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 17650–17655.
- [27] M. Gamier-Lhomme, A. Grelard, R. D. Byrne, C. Loudet, E. J. Dufourc, B. Larjani, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2007**, *1768*, 2516–2527.