

**Membranproteine**

DOI: 10.1002/ange.200504266

**Strukturmodell des membrangebundenen  
C-Terminus des humanen lipidmodifizierten  
N-Ras-Proteins\*\***

*Guido Reuther, Kui-Thong Tan, Julia Köhler,  
Christine Nowak, André Pampel, Klaus Arnold,  
Jürgen Kuhlmann, Herbert Waldmann und  
Daniel Huster\**

Etwa 5 bis 10 % aller zellulären Proteine weisen eine post-translational erworbene Lipidmodifikation auf.<sup>[1]</sup> Insbesondere Proteine, die an der Signaltransduktion beteiligt sind, werden durch diese hydrophoben Gruppen an der Zellmembran verankert.<sup>[2]</sup> Durch diesen Mechanismus wird die Proteindiffusion auf zwei Dimensionen eingeschränkt, wodurch sich die Wahrscheinlichkeit der Wechselwirkung mit

[\*] Dipl.-Phys. G. Reuther, Priv.-Doz. Dr. D. Huster  
Nachwuchsgruppe „Strukturbioologie von Membranproteinen“  
Institut für Biotechnologie  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Kurt-Mothes-Straße 3, 06120 Halle (Deutschland)  
Fax: (+49) 345-55-27013  
E-Mail: daniel.huster@biochemtech.uni-halle.de  
K.-T. Tan, C. Nowak, Priv.-Doz. Dr. J. Kuhlmann,  
Prof. Dr. H. Waldmann  
Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie  
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)  
J. Köhler, Dr. A. Pampel  
Institut für Experimentalphysik II  
Universität Leipzig  
Linnéstraße 5, 04103 Leipzig (Deutschland)  
Dipl.-Phys. G. Reuther, Prof. Dr. K. Arnold, Priv.-Doz. Dr. D. Huster  
Institut für Medizinische Physik und Biophysik  
Universität Leipzig  
Härtelstraße 16–18, 04107 Leipzig (Deutschland)

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft  
(HU 720/5-1 und SFB 642) unterstützt.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter  
<http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor  
angefordert werden.

Downstream-Effektoren um mehrere Größenordnungen erhöht.<sup>[3]</sup> Trotz der großen biologischen Bedeutung dieses Mechanismus zur Membranbindung von Proteinen liegen zum gegenwärtigen Zeitpunkt kaum Strukturdaten lipidmodifizierter Proteine im membrangebundenen Zustand vor. Hier beschreiben wir ein Rückgratstrukturmodell des lipidmodifizierten C-Terminus des N-Ras-Proteins im membranassoziierten Zustand, das durch Festkörper-NMR-Spektroskopie unter Probenrotation im magischen Winkel (magic-angle spinning, MAS) bestimmt wurde.

Ras gehört zu den kleinen GTP-bindenden Proteinen. Es hat eine Schlüsselrolle als molekularer Schalter in der zellulären Signaltransduktion und reguliert Zellproliferation und -differenzierung.<sup>[4]</sup> Mutationen von Ras können zu unkontrolliertem Zellwachstum und letztendlich Krebs führen. Es ist bekannt, dass bei bis zu 30 % aller Krebsfälle des Menschen das Ras-Protein in mutierter Form vorliegt.<sup>[4]</sup> Die N-Ras-Isoform wird posttranslational am C-Terminus lipidmodifiziert (eine Palmitoylkette am Cystein (Cys) 181 und eine Farnesylkette am Cys 186). Diese Ketten dienen als Membrananker für das Protein. Für den löslichen, nicht-lipidmodifizierten Teil des Moleküls liegen bereits Strukturinformationen sowohl für das isolierte Protein als auch für Komplexe mit Effektorproteinen vor. Diese wurden durch Röntgenkristallographie<sup>[5]</sup> oder Lösungs-NMR-Spektroskopie in Abwesenheit von Membranen bestimmt.<sup>[6]</sup> Jedoch ist die aktive Form von Ras an der Membran lokalisiert.<sup>[7]</sup> Die Struktur des Moleküls in diesem Zustand wurde noch nicht untersucht. Alle Mitglieder der Ras-Familie bewirken unterschiedliche biologische Signale, obwohl die N-terminalen Domänen zu mehr als 90 % homolog sind. Dies lässt vermuten, dass der C-Terminus des Proteins essenziell für die biologische Funktion von Ras ist.<sup>[8]</sup>

Bis vor kurzem gab es weder Expressions- oder Syntheseprotokolle, um ausreichende Mengen lipidmodifizierter Ras-Proteine für Strukturuntersuchungen herzustellen, noch spektroskopische Verfahren, um die atomare Struktur membranassozierter Proteine zu bestimmen. Für beide Probleme wurden jedoch kürzlich Lösungen entwickelt. Das lipidmodifizierte Protein kann durch bioorganische Synthese hergestellt werden. Diese konjugiert den rekombinant exprimierten wasserlöslichen Teil des Proteins mit einem lipophilen chemisch synthetisierten Peptid zu einem voll funktionsfähigen Hybridprotein.<sup>[9]</sup> Auf diese Weise können isotopenmarkierte Aminosäuren in spezielle Positionen des lipidmodifizierten C-Terminus des Proteins eingebaut werden. Eine solche Strategie ermöglicht die Untersuchung der Proteinkonformation durch Festkörper-NMR-Spektroskopie, die als vielversprechende Untersuchungsmethode zur Strukturbestimmung von Membranproteinen betrachtet wird.<sup>[10]</sup>

Für die vorliegende Studie wurden zwei lipidmodifizierte Peptide mit unterschiedlichen <sup>13</sup>C-Markierungen synthetisiert (Abbildung 1). Beide Varianten wurden jeweils mit einer S-Hexadecyl- (HD) und einer S-Farnesylkette (Far) an den beiden Cys-Resten versehen.<sup>[11]</sup> Das Protein wurde in deuterierte DMPC-Membranen rekonstituiert und durch MAS-NMR-Spektroskopie untersucht. In Abbildung 1 sind die relevanten Bereiche der <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C- (a, b)<sup>[12]</sup> und <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C-Korrelationsspektren (c, d)<sup>[13]</sup> dargestellt. Die alternierenden Mar-

kierungsmuster verhindern die Überlagerung der meisten Signale und ermöglichen somit eine gute Auflösung. In den <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-Spektren sind die Korrelationssignale aller direkt gebundenen <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-Paare vorhanden. Die typische Linienbreite für die Cα- und Hα-Signale beträgt ca. 1 ppm bzw. 0.15–0.25 ppm. Daraus lässt sich schließen, dass die dipolaren Kopplungen im Molekül durch Bewegungen zwar reduziert werden, aber immer noch stark genug für einen Polarisationstransfer durch Kreuzpolarisation und protonengetriebene Spindiffusion sind. Die <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C-Korrelationsspektren zeigen Kreuzsignale aller benachbarten <sup>13</sup>C-Spins innerhalb der isotopenmarkierten Aminosäuren, z. B. zwischen Cα und CO (Abbildung 1 c,d). Dadurch konnte die komplette Signalzuordnung mithilfe dieser MAS-NMR-Experimente ermittelt werden. Alle Zuordnungen und chemischen Verschiebungen sind in einer Tabelle in den Hintergrundinformationen zusammengefasst.

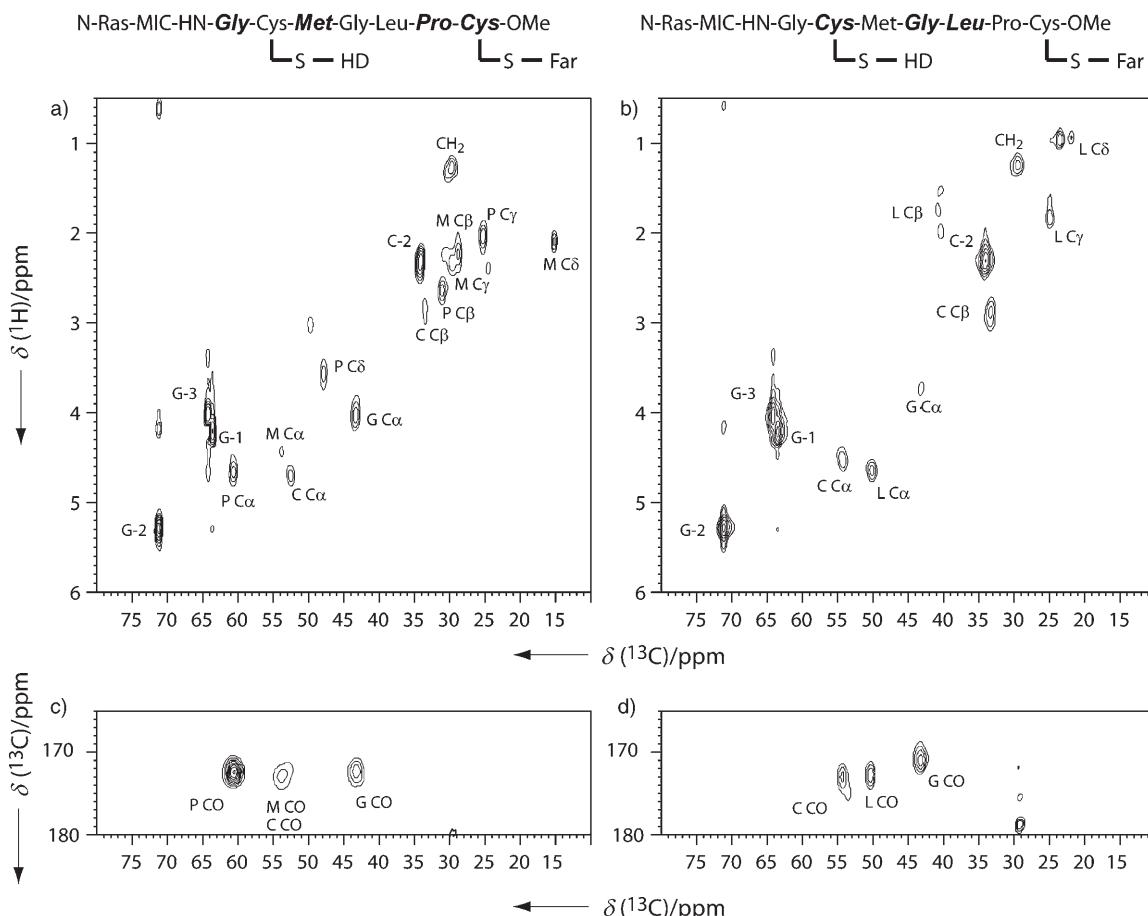
Durch empirische Analyse ist bekannt, dass die sekundäre chemische Verschiebung, d. h. die Differenz zwischen experimentell bestimmter isotroper chemischer Verschiebung und dem entsprechenden Wert für eine Knäuelstruktur, stark mit der Sekundärstruktur eines Proteins korreliert.<sup>[14]</sup> Mithilfe des Datenbankprogramms TALOS können aus den chemischen Verschiebungen die Torsionswinkel des Proteinrückgrats bestimmt werden.<sup>[15]</sup> Dieses Programm sucht in einer Datenbank aus 78 Proteinen bekannter Kristallstruktur und NMR-Zuordnung nach Übereinstimmungen in Sekundärstruktur und chemischer Verschiebung. TALOS findet für Triplets aufeinander folgender Aminosäuren die Torsionswinkel des Proteinrückgrats. Diese bilden die Grundlage für die Berechnung des Strukturmodells des untersuchten Proteins.<sup>[16]</sup>

Als Eingabeparameter für die Strukturbestimmung des C-Terminus von membrangebundenem Ras-Protein wurden die chemischen Verschiebungen von <sup>13</sup>Cα, <sup>13</sup>Cβ, <sup>13</sup>CO und <sup>1</sup>Hα verwendet, die in den MAS-NMR-Experimenten bestimmt wurden. Die Abweichungen zwischen den beobachteten chemischen Verschiebungen und den Werten für die zufällige Struktur nehmen zum Ende der untersuchten Sequenz zu, was schließen lässt, dass die Vorhersage von TALOS für das Ende der untersuchten Sequenz besser wird. Die Rückgrattorsionswinkel für die Aminosäuren 181–185 des C-Terminus

**Tabelle 1:** Rückgrattorsionswinkel für die Membranbindungsdomäne des lipidmodifizierten N-Ras-Proteins.

Aminosäure <sup>[a]</sup>	$\Phi$	$\Psi$
Cys 181	$-135^\circ \pm 20^\circ$	$151^\circ \pm 17^\circ$
Met 182 <sup>[b]</sup>	{ $-67^\circ \pm 11^\circ$ $-79^\circ \pm 23^\circ$ $51^\circ \pm 5^\circ$	$-22^\circ \pm 25^\circ$ $121^\circ \pm 10^\circ$ $45^\circ \pm 7^\circ$
Gly 183	$84^\circ \pm 11^\circ$	$-12^\circ \pm 13^\circ$
Leu 184 <sup>[c]</sup>	$-83^\circ \pm 14^\circ$	$141^\circ \pm 22^\circ$
Pro 185 <sup>[c]</sup>	$-63^\circ \pm 8^\circ$	$147^\circ \pm 9^\circ$

[a] Durch die chemische Kupplung wurde der N-Terminus von N-Ras um zwei Aminosäuren verlängert. Die Nummerierung der Aminosäuren erfolgt hier jedoch dem Wildtyp entsprechend. [b] Für Met 182 wurden von TALOS drei mögliche Torsionswinkelpaare gefunden. [c] Die Differenz in der chemischen Verschiebung von Cβ und Cγ von Prolin 185 deutet auf eine *trans*-Anordnung der Peptidbindung zwischen Leu 184 und Pro 185 ( $\omega = 180^\circ$ ).<sup>[17]</sup>



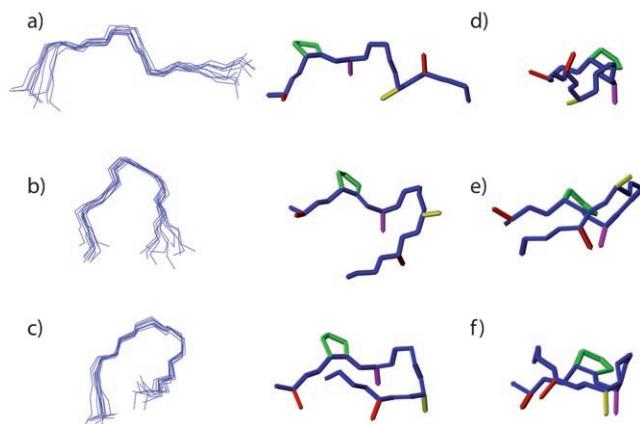
**Abbildung 1.** Konturdiagramme von MAS-NMR-Spektren des lipidmodifizierten membrangebundenen N-Ras-Proteins. a, b) Die  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren liefern in Abhängigkeit von den Markierungsschemata, die oberhalb dargestellt sind, unterschiedliche Kreuzsignalmuster.  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markierte Aminosäuren sind fett und kursiv dargestellt. Zusätzlich zu den Proteinsignalen wurden auch Kreuzsignale von nichtdeuteriertem Glycin (G) und Lipidketten signale (C-2,  $\text{CH}_2$ ) der Membran gemessen. c, d) Der Carbonylbereich der  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren zeigt sechs der sieben  $\text{Ca}-\text{CO}$ -Kreuzpeaks aufgelöst.

von N-Ras sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die Torsionswinkel für Glycin (Gly) 180 und Cys186 konnten nicht mithilfe von TALOS bestimmt werden, da das Programm die chemischen Verschiebungen dreier aufeinander folgender Aminosäuren benötigt, um für die mittlere die Torsionswinkel zu bestimmen. Gly180 und Cys186 sind jedoch die erste bzw. letzte isotopenmarkierte Aminosäure in der untersuchten Sequenz. Außer für Methionin (Met) 182 sind alle Torsionswinkel des Rückgrats eindeutig bestimmt. Für diese Aminosäure wurden drei gleich besetzte Populationen von Rückgrattorsionswinkel gefunden.

Für die Strukturberechnung des C-Terminus des membrangebundenen, lipidmodifizierten Ras-Proteins wurde ein Simulated-Annealing-Protokoll verwendet. Wegen der Mehrdeutigkeit der TALOS-Ergebnisse für Met182 wurden drei unterschiedliche Strukturmodelle des lipidmodifizierten C-Terminus des membrangebundenen Ras-Proteins berechnet. Diese Modelle sind in Abbildung 2 dargestellt. Die linke Spalte zeigt die Überlagerung der zehn energetisch günstigsten Strukturmodelle für jeweils eins der drei möglichen Torsionswinkelpaare von Met182. Die  $\text{Ca}$ -Koordinaten der fünf Aminosäuren, die zur Bestimmung der Torsionswinkel genutzt wurden, zeigen eine mittlere quadratische Abwei-

chung (RMSD) zwischen 0.51 und 0.63 Å (berechnet für 200 Strukturen). Die Gesamtfaltung des C-Terminus des N-Ras-Proteins im membrangebundenen Zustand ähnelt der eines Hufeisens. Der Membrananker von Ras zeigt weder reguläre  $\alpha$ -helicale noch  $\beta$ -Faltblatt-Bereiche. Dies überrascht nicht, da in der untersuchten Sequenz zwei Glycine und ein Prolin (Pro) enthalten sind, die sehr selten in festen Sekundärstrukturen anzutreffen sind. Aufgrund der fehlenden strukturellen Informationen für Gly180 und Cys186 erscheinen die Endbereiche der Sequenz leicht ungeordnet.

Die TALOS-Ergebnisse für Met182 zeigen, dass die Beziehung zwischen Torsionswinkel und chemischer Verschiebung nicht eindeutig ist. Deshalb sind zusätzliche spektroskopische Informationen notwendig, um das wahrscheinlichste Strukturmodell des membrangebundenen Ras-Proteins zu bestimmen. In früheren Studien untersuchten wir die Membranbindung des C-terminalen Heptapeptids mit  $^1\text{H}$ -MAS-NOESY-Spektroskopie.<sup>[19]</sup> Starke intermolekulare Lipid-Peptid-Kreuzsignale deuten darauf hin, dass die hydrophoben Seitenketten (Cys, Leucin (Leu) und Met) in die Membran inserieren.<sup>[19]</sup> Der polare Fünfring von Prolin ist dabei der wässrigen Phase zugewandt.<sup>[20]</sup> Diese Daten liefern zusätzliche Informationen, um das wahrscheinlichste Struk-

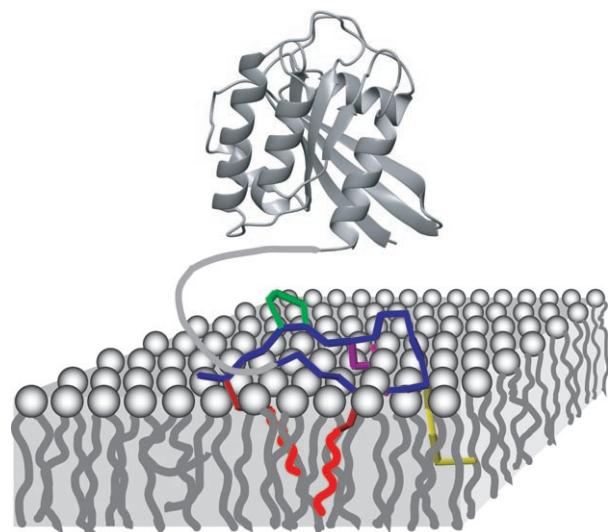


**Abbildung 2.** Festkörper-NMR-Strukturmodelle für den C-Terminus des humanen membrangebundenen, lipidmodifizierten N-Ras-Proteins. Drei Gruppen von Strukturmodellen sind dargestellt, entsprechend der lokalen Sekundärstruktur von Met 182. a–c) Überlagerung der zehn energetisch günstigsten Modelle des Proteinrückgrats. Die mittlere quadratische Abweichung (RMSD) der fünf Aminosäuren, für die TALOS-Torsionswinkel vorliegen, beträgt: a) 0.56, b) 0.51 und c) 0.63 Å. d–f) Unterschiedliche Ansichten des gemittelten Strukturmodells mit dem Rückgrat in Blau und Prolin in Grün. Die C $\beta$ -Atome von Cys, Leu und Met sind in Rot, Gelb bzw. Magenta gezeichnet. Die Strukturen wurden mittels MOLMOL<sup>[18]</sup> dargestellt.

turmodell unter den drei möglichen für die Membranbindungsdomäne von N-Ras auszuwählen.

Es ist jedoch zu beachten, dass die Torsionswinkelvorhersagen von TALOS keinerlei Aussagen über die Seitenketten der Aminosäuren erlauben. Jedoch kann aufgrund der tetraedrischen Geometrie der C $\alpha$ -Atome die Richtung der Seitenkettenorientierung bezüglich des Proteinrückgrats bestimmt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2 dargestellt. Die mittlere und rechte Spalte zeigen zwei unterschiedliche Ansichten des gleichen Strukturmodells. In den Zeilen sind die gemittelten Rückgratstrukturmodelle der N-Ras-Bindungsdomäne für jeweils ein von TALOS vorgeschlagenes Torsionswinkelpaar von Met 182 dargestellt. Diese Modelle schließen die Positionen der C $\beta$ -Atome ein. Bei zwei der drei Strukturmodelle zeigen die hydrophoben Seitenketten in unterschiedliche Richtungen. Dies ist aus thermodynamischen Überlegungen und den für Ras-Peptide gefundenen NOEs zwischen Membran und Seitenketten sehr unwahrscheinlich, da die hydrophoben Seitenketten in die Membran inserieren.<sup>[19]</sup> Somit bleibt nur ein Modell übrig, bei dem die lipidmodifizierten und die hydrophoben Seitenketten in die gleiche Richtung zeigen, wie es für die Membranbindungsdomäne zu erwarten ist (Abbildung 2c,f). In Übereinstimmung mit der empirischen Hydrophobieskala<sup>[20]</sup> zeigt in diesem Modell das Prolin von der Membran weg in Richtung wässriger Phase. Somit stabilisiert die Wechselwirkung des Proteins mit der Membran die Proteinkonformation.

Anhand dieser Ergebnisse haben wir ein Modell für die Struktur des membrangebundenen lipidmodifizierten N-Ras-Proteins erstellt (Abbildung 3). Die Membrantopologie des Proteins ist durch die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den lipidmodifizierten Cysteinen und den hydrophoben



**Abbildung 3.** Strukturmodell des membranassoziierten lipidmodifizierten N-Ras-Proteins (nicht maßstabsgerecht). Der lösliche N-Terminus ist über eine flexible Linkerdomäne mit der Ankerregion verbunden. Die Konformation des N-Terminus (Aminosäuren 1–166) basiert auf der Kristallstruktur.<sup>[5b]</sup> Die Farbkodierung ist identisch mit der in Abbildung 2.

Seitenketten bestimmt. Des Weiteren können Wasserstoffbrücken in der Membrangrenzschicht zwischen dem Peptidrückgrat und den Phospholipiden gebildet werden. Die lipidmodifizierte Bindungsdomäne ist mit der GTP-bindenden N-terminalen Region durch eine Linkerdomäne verknüpft, die relativ flexibel ist.<sup>[6b]</sup> Im Unterschied zum H-Ras gibt es gegenwärtig keine Struktur für den N-Terminus des N-Ras-Proteins. Wegen der Sequenzhomologie von 92 % zwischen H-Ras und N-Ras kann man jedoch davon ausgehen, dass beide Strukturen sehr ähnlich sind.

Biologische Studien haben gezeigt, dass alle Vertreter der Ras-Familie *in vitro* mit den gleichen Effektoren wechselwirken, aber *in vivo* unterschiedliche Informationen weiterleiten. Dies lässt vermuten, dass die biologischen Unterschiede durch die C-Terminali vermittelt werden. Diese Proteinbereiche regulieren auch die Verteilung der Ras-Proteine zwischen Raft- und flüssig-kristallinen Membrandomänen. Dabei finden die verschiedenen Ras-Isoformen ihre Targets durch zwei Strukturelemente: Erstens, die primäre Ankersequenz mit zwei oder drei hydrophoben Modifikationen (Isoprenylierung und S-Acylierung) am N- bzw. H-Ras oder eine Kombination aus positiv geladenen Aminosäuren und Isoprenfunktion beim K-Ras<sup>B</sup>. Zweitens, eine „Linkerdomäne“ am N-terminalen Ende der Membranankersequenz, die die Anlagerung an verschiedene Zellmembranbereiche durch Protein-Protein-Wechselwirkungen bestimmt.<sup>[8]</sup> In diesem Zusammenhang liefert das in dieser Arbeit bestimmte Strukturmodell für die C-terminale Membranbindungsdomäne von N-Ras die erste strukturelle Grundlage für ein vollständigeres Verständnis der biologischen Funktion von Ras in der zellulären Signaltransduktion.

Abschließend sollte betont werden, dass TALOS eine Datenbankanwendung ist. Das mit dieser Prozedur bestimmte Strukturmodell erfüllt nicht die Kriterien einer

hochauflösten Lösungs-NMR-Struktur, die normalerweise durch 20 oder mehr Strukturkonstanten pro Aminosäure festgelegt wird. Trotzdem ist das hier bestimmte Strukturmodell des Ras-Membranankers eine erste Annäherung an dieses Ziel.

## Experimentelles

**Proteinsynthese:** Das N-Ras-Lipoproteid mit N-terminaler Maleimidocaproylfunktion, einem nicht hydrolysierbaren Cystein in der Position des palmitoylierbaren Cysteins und einer Farnesylierung und Carboxymethylierung am C-terminalen Cystein wurde wie bereits beschrieben synthetisiert.<sup>[9]</sup> Die N-Ras-Lipoproteine wurden nach dem bereits beschriebenen Verfahren hergestellt.<sup>[11]</sup> Dafür wurde das Wildtyp-N-Ras-Protein mit deletiertem C-Terminus in *E. coli* CK600K exprimiert und durch DEAE-Ionenaustrauschchromatographie (DEAE: Diethylaminoethyl) und Gelfiltration gereinigt. Die Kupplung mit dem isotopenmarkierten N-Ras-Lipoproteid wurde mit stöchiometrischen Mengen in 20 mM Tris/Cl-Puffer (pH 7.4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) mit Zusatz des Detergents Triton X114 durchgeführt. Das Detergent sorgt für die notwendige Trennung des Lipoproteinkomplexes vom abgespaltenen Bereich nach der vollständigen Kupplungsreaktion. Triton X114 wurde durch zusätzliche DEAE-Ionenaustrauschchromatographie vom N-Ras-Lipoprotein getrennt. Danach erfolgte die Aufkonzentrierung und Abgleichung durch Größenaustrauschfiltration in einem Amicon-Konzentrator bei 20 mM Tris/Cl, pH 7.4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTE (Dithioerythrit). Alle Proteinproben wurden mit SDS-PAGE und MALDI-TOF-Massenspektrometrie überprüft.

**Probenpräparation:** Die großen einschichtigen Vesikeln aus [D<sub>61</sub>]-DMPC wurden mithilfe der Extrudertechnik hergestellt (Puffer: 10 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Hepes, pH 7.4). Entsprechende Mengen des N-Ras-Proteins wurden zu der Liposomenlösung gegeben, um ein Protein/Lipid-Verhältnis von 1:150 zu erreichen. Die gesamte Probe wurde 4 h bei 37°C inkubiert und danach bei ca. 90000 × g 10 h ultrazentrifugiert. Das daraus entstehende Pellet wurde lyophilisiert und mit Wasser hydratisiert, um einen Wasseranteil von 35 Gew.-% zu erreichen. Für die Messungen wurde die Probe in einen 4-mm-MAS-Rotor mit Tefloneinsatz überführt. Eine Proteinbestimmung des Überstands ergab, dass 80–90 % des Proteins an den Liposomen gebunden ist.

**NMR-Spektroskopie:** Die MAS-NMR-Messungen wurden an einem Bruker-Avance-750-WB-Spektrometer mit einer Resonanzfrequenz von 188.5 MHz für <sup>13</sup>C und 749.8 MHz für <sup>1</sup>H durchgeführt. Alle NMR-Spektren wurden bei einer Temperatur von 30°C aufgenommen. Die NMR-Spektren wurden relativ zu TMS akquiriert und für die TALOS-Auswertung relativ zu TSP umskaliert.<sup>[21]</sup> Die <sup>13</sup>C-CP-MAS-Spektren wurden bei einer MAS-Frequenz von 7 kHz mit einer <sup>1</sup>H-Anregungspulslänge von 4 μs und einer CP-Spinlockfeldstärke von ca. 50 kHz (0.7 ms Kontaktzeit) aufgenommen. Die Spektren wurden mit einem Relaxationsdelay von 2.5 bis 3.2 s akkumuliert. Die <sup>1</sup>H-rf-Feldstärke für die heteronukleare TPPM-Entkopplung betrug ca. 65 kHz. Bei den <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-Korrelationsexperimenten wurden 256 Datenpunkte mit einer *t*<sub>1</sub>-Evolutionszeit von 8.5 ms aufgenommen, sodass die gesamte Zeit zur Aufnahme des Spektrums ca. 23 h betrug. Die <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C-Korrelationsspektren wurden in ca. 80 h mit einer Mischzeit von 200 ms, 640 Messungen pro *t*<sub>1</sub>-Inkrement und einer Entwicklungszeit von 2 ms in der indirekten Dimension gemessen.

**Strukturberechnung:** Neben den zehn Torsionswinkel, die für die drei Strukturmodelle durch TALOS bestimmt wurden, deutet die Differenz in der chemischen Verschiebung von C<sub>β</sub> und C<sub>γ</sub> beim Prolin185 auf eine *trans*-Anordnung der Peptidbindung zwischen Leu184 und Pro185 hin.<sup>[17]</sup> Im Ganzen wurden elf Strukturkonstanten für die Rückgratkonformation bestimmt und in der Berechnung mithilfe des Programms DYNAMO 3.1<sup>[22]</sup> verwendet. Für die Berechnungen wurden 200 Konformationen über ein konventionelles

Protokoll mit simulierter Hochtemperatur- und Torsionswinkeldynamik bestimmt. Weitere Details zur Strukturberechnung sind in den Hintergrundinformationen gegeben.

Eingegangen am 1. Dezember 2005,  
veränderte Fassung am 30. Mai 2006  
Online veröffentlicht am 17. Juli 2006

**Stichwörter:** Membranproteine · NMR-Spektroskopie · Ras-Protein · Signaltransduktion

- [1] *Lipid Modification of Proteins* (Hrsg.: M. J. Schlesinger), CRC, Boca Raton, **1993**.
- [2] P. J. Casey, *Science* **1995**, *268*, 221–225.
- [3] D. Murray, N. Ben-Tal, B. Honig, S. McLaughlin, *Structure* **1997**, *5*, 985–989.
- [4] A. Wittinghofer, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4360–4383; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4192–4214.
- [5] a) M. V. Milburn, L. Tong, A. M. deVos, A. Brünger, Z. Yamazumi, S. Nishimura, S. H. Kim, *Science* **1990**, *247*, 939–945; b) E. F. Pai, W. Kabsch, U. Krengel, K. C. Holmes, J. John, A. Wittinghofer, *Nature* **1989**, *341*, 209–214.
- [6] a) P. J. Kraulis, P. J. Domaille, S. L. Campbell-Burk, T. Van Aken, E. D. Laue, *Biochemistry* **1994**, *33*, 3515–3531; b) R. Thapar, J. G. Williams, S. L. Campbell, *J. Mol. Biol.* **2004**, *343*, 1391–1408.
- [7] T. Dudler, M. H. Gelb, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 11541–11547.
- [8] R. G. Parton, J. F. Hancock, *Trends Cell Biol.* **2004**, *14*, 141–147.
- [9] B. Bader, K. Kuhn, D. J. Owen, H. Waldmann, A. Wittinghofer, J. Kuhlmann, *Nature* **2000**, *403*, 223–226.
- [10] a) J. Torres, T. J. Stevens, M. Samso, *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28*, 137–144; b) S. Luca, H. Heise, A. Lange, M. Baldus, *Arch. Pharm.* **2005**, *338*, 217–228; c) D. Huster, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2005**, *46*, 79–107.
- [11] M. Volkert, K. Uwai, A. Tebbe, B. Popkirova, M. Wagner, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12749–12758.
- [12] C. W. Lee, R. G. Griffin, *Biophys. J.* **1989**, *55*, 355–358.
- [13] N. M. Szeverenyi, M. J. Sullivan, G. E. Maciel, *J. Magn. Reson.* **1982**, *47*, 462–475.
- [14] a) D. S. Wishart, B. D. Sykes, *Methods Enzymol.* **1994**, *239*, 363–392; b) S. Spera, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5490–5492; c) H. Saitô, *Magn. Reson. Chem.* **1986**, *24*, 835–852.
- [15] G. Cornilescu, F. Delaglio, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **1999**, *13*, 289–302.
- [16] a) S. Luca, J. F. White, A. K. Sohal, D. V. Filippov, J. H. van Boom, R. Grisshammer, M. Baldus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 10706–10711; b) A. T. Petkova, Y. Ishii, J. J. Balbach, O. N. Antzutkin, R. D. Leapman, F. Delaglio, R. Tycko, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 16742–16747; c) S. Sharpe, W.-M. Yau, R. Tycko, *Biochemistry* **2006**, *45*, 918–933.
- [17] S. K. Sarkar, T. D. Kopple, D. L. VanderHart, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 3328–3331.
- [18] R. Koradi, M. Billeter, K. Wüthrich, *J. Mol. Graphics* **1996**, *14*, 51–55.
- [19] a) D. Huster, A. Vogel, C. Katzka, H. A. Scheidt, H. Binder, S. Dante, T. Gutberlet, O. Zschörnig, H. Waldmann, K. Arnold, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4070–4079; b) D. Huster, K. Kuhn, D. Kadereit, H. Waldmann, K. Arnold, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1083–1085; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1056–1058.
- [20] W. C. Wimley, S. H. White, *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 842–848.
- [21] C. R. Morcombe, K. W. Zilm, *J. Magn. Reson.* **2003**, *162*, 479–486.
- [22] G. Kontaxis, F. Delaglio, A. Bax, *Methods Enzymol.* **2005**, *394*, 42–78.