

In-vivo-Testsysteme für Protein-Protein-Wechselwirkungen: eine Methode nicht nur für Proteine**

Hening Lin und Virginia W. Cornish*

Im Jahre 1989 entwickelten Fields und Song das Zwei-Hybrid-System in Hefe, das den direkten Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen in vivo ermöglicht.^[1] Bis zur Einführung dieser Methode wurde die Proteinbindung mit traditionellen biochemischen Techniken wie Co-Immunopräzipitation, Affinitätschromatographie und Photoaffinitätsmarkierung nachgewiesen.^[2] Drei überzeugende Vorteile des neuen In-vivo-Tests führten sehr schnell zu einer weiten Verbreitung: Erstens ist er technisch unaufwendig und schnell ausführbar, zweitens kann die Sequenz der beiden wechselwirkenden Proteine sofort aus der DNA-Sequenz des codierenden Plasmids abgelesen werden und drittens hängt die Methode nicht von einem speziellen wechselwirkenden Protein ab und ist daher allgemein verwendbar.

Das Zwei-Hybrid-System beruht auf der Beobachtung, dass eukaryontische Transkriptions-Aktivatoren in zwei funktional unabhängige Domänen getrennt werden können: eine DNA-bindende Domäne (DBD) und eine Transkriptions-aktivierende Domäne (AD). Transkriptions-Aktivatoren können durch Mischen und Zusammenfügen dieser beiden Domänen erzeugt werden. Offenbar muss die aktivierende Domäne durch die DNA-bindende Domäne lediglich in die Nähe des Transkriptions-Starts dirigiert werden, was nahe legt, dass die Verbindung zwischen den beiden Domänen wahrscheinlich ohne den Verlust der Aktivität verändert werden kann. So genügt im Zwei-Hybrid-System eine nicht-kovalente Bindung zwischen den beiden wechselwirkenden Proteinen. Das Zwei-Hybrid-System in Hefe besteht aus zwei chimären Proteinen und einem Reportergen, das stromabwärts von der Bindungsstelle des Transkriptions-Aktivators liegt (Abbildung 1). Wenn die beiden Proteine X und Y in Wechselwirkung treten, dimerisieren sie das DNA-bindende (DBD-X) mit dem Transkriptions-aktivierenden Fusionsprotein (AD-Y). Durch das Zusammenwirken von DNA-bindender und Transkriptions-aktivierender Domäne bildet sich der Transkriptions-Apparat an einem Promotor in der Nähe

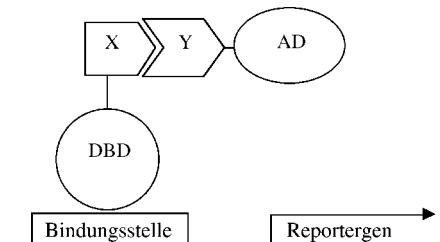


Abbildung 1. Das Hefe-Zwei-Hybrid-System. DBD-X ist ein chimäres Protein, das aus einer DNA-bindenden Domäne (DBD) besteht, die mit einem Protein X fusioniert ist; AD-Y ist ein zweites chimäres Protein aus einer Transkriptions-aktivierenden Domäne (AD) und einem Protein Y. Wenn die Proteine X und Y mit hinreichender Affinität aneinander binden, wird die AD in die Nähe des Reportergens gebracht und dessen Transkription aktiviert.

der Bindungsstelle für die aktivierende Domäne, und dadurch wird die Transkription des Reportergens aktiviert.

Das Testsystem wurde zuerst an zwei Hefeproteinen untersucht, von denen bekannt war, dass sie in vivo physikalisch assoziiert sind.^[1] Das SNF1-Protein aus Hefe, eine Serin-Threonin-Proteinkinase, wurde mit der GAL4-DNA-Bindungs-Domäne fusioniert, während das SNF1-Aktivatorprotein SNF4 mit der GAL4-Aktivatordomäne fusioniert wurde. Eine GAL4-bindende DNA-Sequenz wurde stromaufwärts von einem β -Galactosidase-Reportergen eingefügt. Plasmide, die die Fusionsproteine und das Reportergen codieren, wurden in Hefe transformiert, und die β -Galactosidasesynthese wurde mit biochemischen Standardmessmethoden verfolgt. In Kontrollversuchen wurde gezeigt, dass weder die DBD- und AD-Domänen allein noch die einzelnen chimären Proteine die Synthese von β -Galactosidase über das Hintergrundniveau hinaus induzierten. Die Synthese von β -Galactosidase wurde 200fach gesteigert, wenn die DBD-SNF1- und SNF4-AD-Fusionsproteine gemeinsam übertragen wurden. Im Vergleich dazu wurde die Synthese von β -Galactosidase durch ein DBD-AD-Fusionsprotein um das 4000fache gesteigert.

Seit der ersten Veröffentlichung von Fields und Song hat es erhebliche technische Verbesserungen der Methode gegeben; mittlerweile gehört sie zu den Standardmethoden der Biochemie und Genetik. So nutzten Murray et al.^[3] das Hefe-Zwei-Hybrid-System als ersten Schritt, um ihre Hypothese zu testen, dass die Cyclin-abhängige Kinase Cdc20 das Zielpro-

[*] Prof. V. W. Cornish, H. Lin
Department of Chemistry, Columbia University
New York, NY 10027 (USA)
Fax: (+1) 212-932-1289
E-mail: vc114@columbia.edu

[**] Wir danken Tony Siu, Dr. Charles Cho und den Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe für die hilfreichen Kommentare zum Manuscript.

tein für die Kontrolle der Spindel in sprossender Hefe ist; dazu testeten sie, ob irgendein Protein, das bekanntermaßen an der Kontrolle der Spindel beteiligt ist, physikalisch mit Cdc20 in Kontakt tritt. Das Hefe-Zwei-Hybrid-System erleichtert die Entdeckung von Kaskaden zusammenwirkender Proteine – in diesem Fall für die Kontrolle des Spindelapparates – und ermöglicht so, vollständige Stoffwechselwege zusammenzufügen und zu verstehen, wie deren Proteine im Inneren der Zelle zusammenwirken. Ein aktueller Trend ist, Automatisierungstechniken zur Durchsuchung ganzer Genome einzusetzen.^[4] Jeder offene Leserahmen, der ein Protein codiert – in sprossender Hefe sind dies etwa 6000 –, wird mit der DBD und der AD fusioniert, und dann werden beide Bibliotheken mit Fusionsproteinen getestet und verglichen.

Aufgrund der inzwischen vielfältigen Nutzung des Zwei-Hybrid-Systems konnten Tausende neuer Protein-Protein-Wechselwirkungen identifiziert werden.^[4, 5] Dadurch angeregt haben verschiedene Arbeitsgruppen damit begonnen, auf der Transkription basierende Tests zu entwickeln, die in Bakterien durchgeführt werden können. Außerdem werden Protein-Protein-Wechselwirkungs-Tests mit anderen Messverfahren wie Enzymkomplementation oder Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Übertragung (fluorescence resonance energy transfer, FRET) gekoppelt. Zusätzlich wird der Test auf die Untersuchung anderer Wechselwirkungen übertragen. Es gibt auch Ein-Hybrid-Testsysteme zur Detektion von DNA-Protein-Wechselwirkungen und Drei-Hybrid-Systeme für Wechselwirkungen zwischen RNA und Proteinen und kleinen Molekülen und Proteinen. Einige dieser Entwicklungen werden in diesem Beitrag beschrieben.

In-vivo-Testsysteme für Protein-Protein-Wechselwirkungen

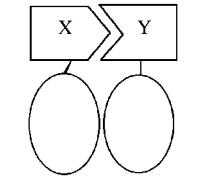
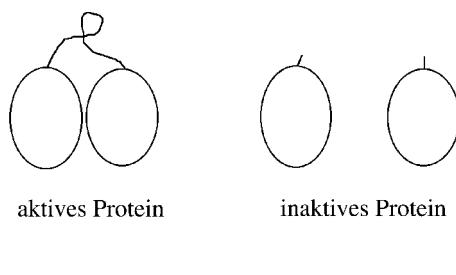
Während es wegen der Ähnlichkeiten bei der Transkription unter Eukaryonten möglich ist, das Hefe-Zwei-Hybrid-System einfach auf Säuger-Zelllinien zu übertragen, müssen für Bakterien neue auf der Transkription basierende Tests entwickelt werden. Es gibt mehrere potentielle Vorteile, mit Bakterien zu arbeiten. Viele allgemein gebräuchliche molekularebiologische Techniken wurden für *Escherichia coli* optimiert. Da die Transformation bei *E. coli* um mehrere Größenordnungen effizienter abläuft als bei Hefe, können mehr Proteinvarianten durchgemustert werden. Die kurze Verdopplungszeit von *E. coli* verkürzt die Zeit für die Selektionsexperimente. Mehrere Jahre lang wurde nur das Hefe-Zwei-Hybrid-System genutzt. Erst in letzter Zeit wurden erste bakterielle Testsysteme für Protein-Protein-Wechselwirkungen beschrieben.^[6–9]

Bei einem Ansatz zur Entwicklung von Tests in Bakterien, die auf der Transkription basieren, wird die Tatsache genutzt, dass viele bakterielle Repressoren und Aktivatoren dimere Proteine sind, die strukturell voneinander unterscheidbare Domänen für die DNA-Bindung und Dimerisierung aufweisen. Hu et al.^[6] konnten zeigen, dass die C-terminale Dimerisierungs-Domäne des λ -Repressors durch die Leucin-Reißverschluss-Dimerisierungs-Domäne des Transkriptions-Aktivators GCN4 aus Hefe ersetzt werden kann. Das chimäre Protein ist stabil und kann den λ -Repressor in vivo funktionell

ersetzen: Es verleiht Immunität gegen eine Superinfektion durch den λ -Bakteriophagen und reprimiert effizient einen künstlichen λ -Promotor und das β -Galactosidase-Reporterprotein. Daneben gibt es noch weitere Strategien, um Protein-Protein-Wechselwirkungen in Bakterien zu untersuchen.^[6–9]

Des Weiteren besteht ein Interesse an der Entwicklung von Testsystemen für Protein-Protein-Wechselwirkungen, die nicht auf Aktivatoren oder Repressoren der Transkription beruhen. Unsere Kenntnisse über den biochemischen Mechanismus der Transkription in Eukaryonten legt nahe, dass mit Zwei-Hybrid-Systemen schwache Wechselwirkungen entdeckt werden können und sie weitgehend unempfindlich auf Konformationsänderungen reagieren. Hier könnten andere Tests effektiver sein. Dazu wurden mehrere Methoden ausgearbeitet. Im Allgemeinen beruhen sie auf der induzierten Wechselwirkung von zwei komplementären Fragmenten eines Proteins, durch die entweder eine enzymatische Aktivität oder FRET rekonstituiert wird.^[9–13]

Ein solches Testsystem beruht auf der Synthese von cyclischem Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) durch Adenylylatcyclase (Abbildung 2).^[9] Die Adenylylatcyclase aus



Rekonstitution des aktiven Proteins

Abbildung 2. Protein-Komplementations-Testsystem. Ein Protein, das eine essentielle Funktion ausübt, wird in zwei Hälften gespalten, die inaktiv sind, wenn sie nicht mehr miteinander verbunden sind. Die beiden Teile werden mit den Proteinen X und Y fusioniert. Wenn X und Y aneinander binden, wird die Funktion des Proteins rekonstituiert, sodass ein nachweisbares zelluläres Messsignal entsteht.

Bordetella pertussis kann in zwei funktionell komplementäre Fragmente, T18 und T25, gespalten werden; Proteindimerisierung kann dann mit Hilfe der Dimerisierung von T18 und T25 und der Rekonstitution der Adenylylatcyclase-Aktivität bestimmt werden. Die Adenylylatcyclase ist ein essentielles Enzym für die Synthese von cAMP. cAMP aktiviert das Katabolit-Aktivatorprotein (CAP), und der aktivierte cAMP/CAP-Komplex induziert die Transkription verschiedener Gene, z.B. des *lac*-Operons. Es ist daher möglich, mit β -Galactosidase-Tests auf Agarplatten oder einer Wachstumsselektion auf Lactose-Medium, ein Screening auf Adenylylatcyclase-Aktivität durchzuführen. Ladant et al.^[9] zeigten, dass die Dimerisierung der Leucin-Reißverschluss-Domäne von

GCN4, der N-terminalen Domäne der Tyrosyl-tRNA-Synthase und der Hefe-Spleißfaktoren Prp11 und Prp12 mit dieser Methode nachgewiesen werden kann. Ähnliche Konzepte, denen die Rekonstitution der Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) oder der β -Galactosidase zugrundeliegt, sind auch von Remy und Michnick^[12] und von Blau et al.^[11] beschrieben worden. Interessant wäre ein Vergleich der Vorzüge der unterschiedlichen Testsysteme; möglicherweise können auch Tests verwendet werden, die konformationsabhängig sind oder andere vermeintliche Schwächen haben.

DNA- und RNA-Protein-Wechselwirkungen

Bereits früh erkannte man, dass, wie das Hefe-Zwei-Hybrid-System zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen verwendet werden kann, Transkriptions-Aktivatoren direkt in einem „Ein-Hybrid-System“ zum Nachweis von DNA-Protein-Wechselwirkungen genutzt werden können (Abbildung 3A). DNA-bindende Proteine, die an eine vor-

Transkriptions-Aktivator, der als entscheidender Schalter für die koordinierte Expression geruchsspezifischer Gene gilt.^[14] Schon früher war ein Faktor identifiziert worden, der nur in Kernextrakten des Nasenepithels, nicht aber in anderen Geweben exprimiert wird. Die Schwierigkeit bestand darin, diesen Faktor zu klonieren und sequenzieren. Eine cDNA-Bibliothek aus Riechgewebe wurde in ein GAL4-AD-Plasmid subkloniert, sodass Millionen von Plasmiden entstanden, von denen jedes ein anderes olfaktorisches Protein an GAL4-AD fusioniert exprimierte. Diese Plasmide wurden dann in einen Hefestamm transformiert, dessen Olf1-GAL4-Fusionsprotein aus Millionen anderer olfaktorischer Proteinfusionen herausselktiert werden konnte, indem eine Wachstumsselektion auf die Transkription eines essentiellen Histidin-Biosynthesegens durchgeführt wurde. Mit einer gänzlich anderen Absicht nutzten Pabo et al. vor kurzem ein bakterielles Ein-Hybrid-System für ihre Selektion: Sie wollten keine natürlichen DNA-Protein-Wechselwirkungen untersuchen, sondern ein DNA-bindendes Zinkfingerprotein erzeugen, das an eine bestimmte DNA-Target-Sequenz bindet.^[8]

Die Detektion von RNA-Protein-Wechselwirkungen ist komplizierter, weil RNA-Protein-Fusionen nicht direkt *in vivo* erzeugt werden können und weil es keine biochemischen Standardverfahren gibt, die die RNA-Bindung in ein verstärkbares Signal umwandeln. Diese Schwierigkeit wurde durch die Erweiterung des Zwei-Hybrid-Systems zum Drei-Hybrid-System durch eine dritte Komponente überwunden (Abbildung 3B).^[15, 16] Die dritte Komponente ist ein hybrides RNA-Molekül, dessen eine Hälfte ein gut untersuchtes RNA-Molekül ist, das mit hoher Affinität an ein bekanntes Protein bindet. Die andere Hälfte ist die zu untersuchende RNA, deren Protein-Bindungsparter gesucht wird. Insgesamt besteht das Drei-Hybrid-System also aus zwei Fusionsproteinen, einer RNA-Chimäre und einem Reportergen. Das hybride RNA-Molekül verbindet die Fusionsproteine mit der DNA-bindenden und der Aktivierungsdomäne und aktiviert die Transkription eines Reportergens. Wickens et al.^[15] setzten dieses Drei-Hybrid-System als erste zusammen und nutzten es dann, um ein regulatorisches Protein aus *Ceenorhabditis elegans* zu identifizieren, das an die nichttranslatierte 3'-Region des fem-3-Gens bindet und die Umschaltung zwischen Spermium und Oocyte in Zwittern vermittelt.^[16]

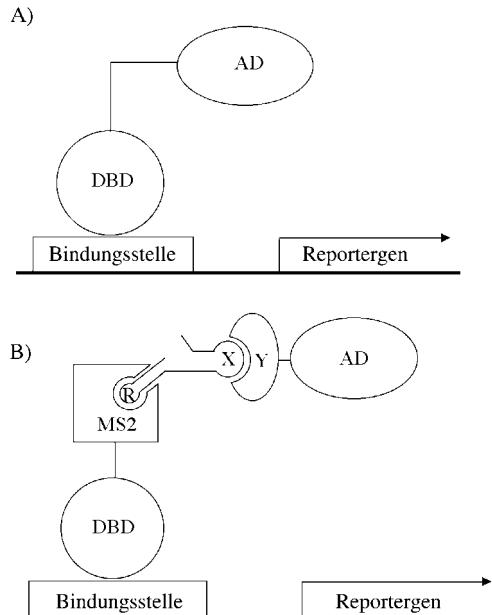


Abbildung 3. Ein- und Drei-Hybrid-Systeme. A) Im Ein-Hybrid-System wird die Transkriptions-aktivierende Domäne AD direkt mit der DNA-bindenden Domäne DBD fusioniert. Mit diesem Test kann entweder eine DBD identifiziert werden, die direkt an eine spezifische DNA-Sequenz bindet, oder eine Bindungsstelle für eine vorgegebene DBD. B) Im Unterschied zu dem Hefe-Zwei-Hybrid-System hat das Drei-Hybrid-System, mit dem RNA-Protein-Wechselwirkungen nachgewiesen werden, als zusätzliche Komponente ein hybrides RNA-Molekül. Eine Hälfte der hybriden RNA ist eine bekannte RNA (R), die mit hoher Affinität das MS2-Hüllprotein (MS2) binden kann und als Anker fungiert. Die andere Hälfte ist die RNA X, deren Wechselwirkung mit dem Protein Y getestet wird.

gegebene DNA-Zielsequenz binden, konnten aus cDNA-Bibliotheken isoliert werden, in denen alle exprimierten Proteine eines vorgegebenen Organismus oder eines spezifischen Zelltyps vertreten sind. Außerdem konnten die optimalen oder natürlich vorkommenden Erkennungssequenzen für ein vorgegebenes regulatorisches Protein bestimmt werden. So klonierten Wang und Reed beispielsweise Olf-1, einen

Wechselwirkungen zwischen kleinen Molekülen und Proteinen

So wie ein RNA-Molekül eingeführt werden kann, um die Wechselwirkung zwischen der DNA-bindenden und der aktivierenden Domäne zu vermitteln, kann dies auch mit Hilfe eines kleinen Moleküls geschehen. Diese kleinen Moleküle wurden oft chemische Dimerisierungs-Induktoren (CIDs, chemical inducers of dimerization) genannt. Inzwischen werden monomere und dimere kleine Moleküle verwendet. Stan et al.^[17] zeigten, dass das Pharmakophor Rapamycin zwei Fusionsproteine dimerisieren kann, das DBD-TOR2-Fusionsprotein (TOR = targets of rapamycin) und das FK506/Rapamycin-Bindeprotein (FKBP12)-AD, wodurch die Transkription eines Reportergens aktiviert wird. Dieses Ergebnis stimmte mit früheren biochemischen Daten überein, nach denen Rapamycin *in vivo* wirken sollte, indem

es TOR2 und FKBP12 dimerisiert. Außerdem konnte mit dem Transkriptions-Test gezeigt werden, dass für die Wechselwirkung in TOR2 ein konservierter Serinrest notwendig ist, denn eine Ser1975 → Arg-Mutante von TOR2 konnte das Reportergen nicht aktivieren. Gleichzeitig konnten Chiu et al.^[18] mit einem ähnlichen auf der Transkription basierenden Testsystem ein Säugerhomologes von Hefe-TOR aus einer Maus-cDNA-Bibliothek identifizieren, womit gezeigt war, dass dieses modifizierte Zwei-Hybrid-System auch in Screening- und Selektionsansätzen in großem Maßstab brauchbar ist.

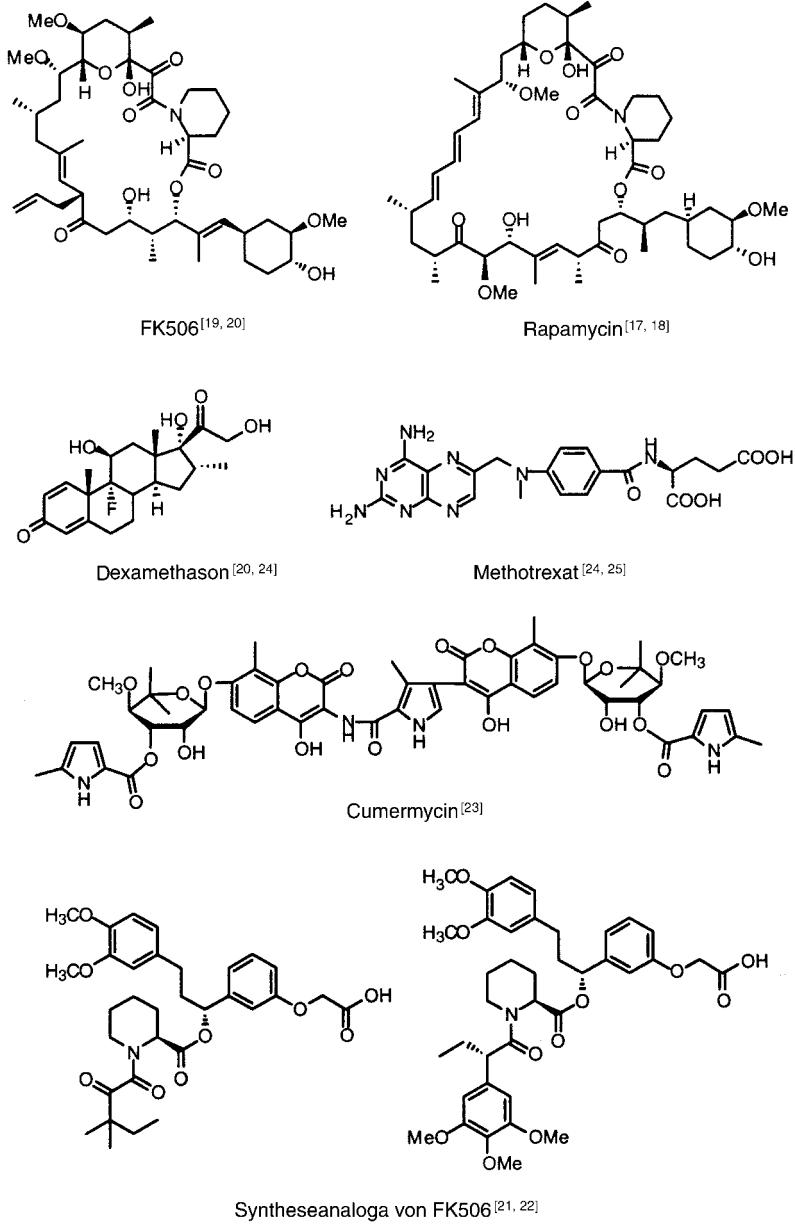
Dimere CID's wurden oft in gleicher Weise verwendet wie hybride RNA-Moleküle, wobei die eine Hälfte des Moleküls als Anker diente und die andere Hälfte die zu untersuchende Komponente war. Die ersten dimeren CID's waren Dimere des Immunsuppressors FK506.^[19] Licitra und Liu^[20] entwickelten den von ihnen als „Hefe-Drei-Hybrid-System“ bezeichneten Test mit zwei Fusionsproteinen: dem Glucocorti-

coidrezeptor (GR), fusioniert mit dem DNA-Bindeprotein LexA, und FKBP12, fusioniert mit der Transkriptions-aktivierenden Domäne von B42. Die beiden Moleküle werden über das heterodimere Dexamethason-FK506-Molekül verbunden. Dexamethason bindet, ebenso wie FK506 an FKBP12, an den GR mit einer Dissoziationskonstante im niederen nanomolaren Bereich.

Schlüssel zum Erfolg dieser Systeme sind höchstwahrscheinlich die Ligand-Rezeptor-Paare, sodass sich ein großer Teil der Forschung auf die Entwicklung neuer CID-Paare konzentriert. Forscher von ARIAD Gene Therapeutics haben mehrere CID's entwickelt, die sich von Syntheseanaloga des FK506 ableiten.^[21, 22] Auch Cumermycin, ein natürlich vorkommendes asymmetrisches Homodimer, wurde bereits als CID genutzt.^[23] Wir selbst haben kürzlich ein Dexamethason-Methotrexat-CID beschrieben, das im Hefe-Drei-Hybrid-System effizient den GR und die Dihydrofolat-Reductase (DHFR) dimerisiert.^[24] Der Hauptvorteil dieses Systems ist,

dass Dexamethason und Methotrexat leicht erhältlich sind und sich das heterodimere Derivat einfach synthetisieren lässt. Außerdem trägt die Affinität von Methotrexat für die *E. coli*-DHFR – die Dissoziationskonstante liegt im niederen picomolaren Bereich – wahrscheinlich zur Wirksamkeit dieses CID bei. An der Entwicklung eines Methotrexat-Homodimers für den Gebrauch im bakteriellen λ-Repressor-System wird momentan gearbeitet.^[25]

In ihrer einfachsten Anwendung können CID's in Kombination mit auf der Transkription basierenden Dimerisierungs-Testsystemen als diffusionsfähige Induktoren der Gentran- skription genutzt werden; daneben gibt es noch viele andere Anwendungen. Licitra und Liu^[20] vermuteten, dass diese Systeme auch für die Identifizierung der zellulären Zielstrukturen bekannter Pharmakophore tauglich sind. Den prinzipiellen Nachweis führten sie mit dem Immunsuppressor FK506 durch. Sie zeigten, dass ein Heterodimer aus Dexamethason und FK506 verwendet werden kann, um die natürliche Zielstruktur von FK506, FKBP12, aus einer mit der B42-Aktivierungsdomäne fusionierten Jurkat-cDNA-Bibliothek zu selektieren. Das Hefe-Drei-Hybrid-System ist auch als Methode zur Herstellung von Proteinen mit neuen Bindungsspezifitäten brauchbar. Eine Variante der FKBP12-Rapamycin-bindenden Domäne (FRB) des FKBP12-Rapamycin-assoziierten Proteins (FRAP), die für ein Rapamycin-Analogon selektiv ist, wurde von Liberles et al.^[26] mit einem Drei-Hybrid-System aus einer Bibliothek von FRB-Mutanten in einer Säuerzelllinie isoliert. Die FRB-Mutanten wurden so entworfen, dass sie in ihrem Bindungszentrum eine neue Tasche für einen zusätzlichen Substituenten haben, der an Rapamycin angebracht wurde, um die Bindung von



Wildtyp-FRB zu blockieren. Die selektivste Mutante wurde bei einer Durchmusterung verschiedener FRB-Mutanten im Drei-Hybrid-System gefunden.

Fazit

Mit dem Zwei-Hybrid-System wurden bereits Tausende neuer Protein-Wechselwirkungen entdeckt – was bleibt also noch zu tun? Eine offene Frage ist, ob andere Dimerisierungstests vielleicht noch wirkungsvoller sind als das Zwei-Hybrid-System, z.B. um schwächere Wechselwirkungen nachzuweisen, oder solche Methoden, die weniger empfindlich gegenüber Konformationsänderungen sind. Es wird interessant sein zu beobachten, wie neue In-vivo-Dimerisierungs- tests sich in den nächsten Jahren bewähren werden. Es gibt noch zahlreiche Möglichkeiten zur Verbesserung der Handhabung von Kombinationen aus RNA oder kleinen Molekülen mit Rezeptoren im Hefe-Drei-Hybrid-System, um die Empfindlichkeit zu steigern. Die zentrale Frage ist allerdings, wie diese Methode weiter genutzt werden kann. Nachdem Tausende neuer Protein-Wechselwirkungen entdeckt worden sind, bietet das Feld noch immer reiche Betätigungs möglichkeiten für Chemiker, die am Verständnis und der Manipulation biologischer Wechselwirkungen interessiert sind.^[8, 26] Noch spannender allerdings ist die Möglichkeit, dass dieser Test für mehr als nur als Messsignal für bindende Wechselwirkungen verwendet werden kann.^[27, 28]

- [1] S. Fields, O. Song, *Nature* **1989**, *340*, 245–246.
- [2] E. M. Phizicky, S. Fields, *Microbiol. Rev.* **1995**, *59*, 94–123.
- [3] L. H. Hwang, L. F. Lau, D. L. Smith, C. A. Mistrot, K. G. Hardwick, E. S. Hwang, A. Amon, A. W. Murray, *Science* **1998**, *279*, 1041–1044.
- [4] P. Uetz, L. Giot, G. Cagney, T. Mansfield, R. Judson, J. Knight, D. Lockshon, V. Narayan, M. Srinivasan, P. Pochart, A. Qureshi-Emili, Y. Li, B. Godwin, D. Conover, T. Kalbfleisch, G. Vijayadamodar, M. Yang, M. Johnston, S. Fields, J. Rothberg, *Nature* **2000**, *403*, 623–627.
- [5] Diese miteinander wechselwirkenden Proteine können inzwischen online gesucht werden unter <http://portal.curagen.com>.
- [6] J. C. Hu, E. K. O’Shea, P. S. Kim, R. T. Sauer, *Science* **1990**, *250*, 1400–1403.

- [7] S. Dove, J. K. Joung, A. Hochschild, *Nature* **1997**, *386*, 627–630.
- [8] J. K. Joung, E. I. Ramm, C. O. Pabo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 7382–7387.
- [9] G. Karimova, J. Pidoux, A. Ullmann, D. Ladant, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 5752–5756.
- [10] S. Adams, A. Harootunian, Y. Buechler, S. Taylor, R. Tsien, *Nature* **1991**, *349*, 694–697.
- [11] F. Rossi, C. Charlton, H. Blau, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 8405–8410.
- [12] I. Remy, S. Michnick, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 5394–5399.
- [13] N. Johnsson, A. Varshavsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 10340–10344.
- [14] M. M. Wang, R. R. Reed, *Nature* **1993**, *364*, 121–126.
- [15] D. SenGupta, B. Zhang, B. Kraemer, P. Pochart, S. Fields, M. Wickens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 8496–8501.
- [16] B. Zhang, M. Gallegos, A. Puoti, E. Durkin, S. Fields, J. Kimble, M. P. Wickens, *Nature* **1997**, *390*, 477–484.
- [17] R. Stan, M. M. McLaughlin, R. Cafferkey, R. K. Johnson, M. Rosenberg, G. P. Livi, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 32027–32030.
- [18] M. I. Chiu, H. Katz, V. Berlin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 12574–12578.
- [19] D. Spencer, T. Wandless, S. Schreiber, G. Crabtree, *Science* **1993**, *262*, 1019–1024.
- [20] E. Licitra, J. Liu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 12817–12821.
- [21] J. Amara, T. Clackson, V. Rivera, T. Guo, T. Keenan, S. Natesan, R. Pollock, W. Yang, N. Courage, D. Holt, M. Gilman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 10618–10623.
- [22] T. Clackson, W. Yang, L. W. Rozamus, M. Hatada, J. F. Amara, C. T. Rollins, L. F. Stevenson, S. R. Magar, S. A. Wood, N. L. Courage, X. Lu, F. Cerasoli, M. Gilman, D. A. Holt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 10437–10442.
- [23] M. A. Farrar, J. Alberola-lla, R. M. Perlmutter, *Nature* **1996**, *383*, 178–181.
- [24] H. Lin, W. M. Abida, R. Sauer, V. Cornish, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4247–4248.
- [25] S. J. Kopytek, R. F. Standaert, J. C. Dyer, J. C. Hu, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 313–321.
- [26] S. D. Liberles, S. T. Diver, D. J. Austin, S. L. Schreiber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 7825–7830.
- [27] S. Firestone, F. Salinas, A. Nixon, S. Baker, S. Benkovic, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 544–547.
- [28] R. Briesewitz, G. Ray, T. Wandless, G. Crabtree, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 1953–1958.