

Proteintango: wie man den Partner einfängt

Anna Rutkowska und Carsten Schultz*

Dimerisierer · Niedermolekulare Verbindungen ·

Protein-Protein-Interaktionen · Verknüpfer

Die Bestimmung von Proteinfunktionen in lebenden Zellen ist essenziell, um Zellen und Organismen zu verstehen. Von besonderer Wichtigkeit ist dabei die Ermittlung und Beeinflussung von Protein-Protein-Interaktionen. In den letzten Jahren wurden mehrere Methoden entwickelt, um Protein-Protein-Interaktionen in lebenden Zellen zu messen bzw. zu induzieren. Daher sind jetzt Werkzeuge verfügbar, um intrazelluläre Abläufe spezifisch durch reversibles oder irreversibles Verknüpfen zu manipulieren. Dies kann neue Türen öffnen, um komplizierte Proteinnetzwerke im Detail zu analysieren. Hier beschreiben wir die verfügbaren Verknüpfungs- und Dimerisierungsreagentien und ihre Anwendungen.

1. Einführung

In Zellen wird die Proteinfunktion meist durch die Bildung von Multiproteinkomplexen und die Dynamik der Protein-Protein-Interaktionen (PPI) bestimmt. Die Techniken zur Entdeckung und Untersuchung von PPIs in intakten Zellen innerhalb einer kurzen Zeitskala sind 1) die Visualisierung von Proteinlokalisationen und -interaktionen durch Proteinfragmentkomplementationassays oder durch Lichtmikroskopie mittels resonantem Förster-Energietransfer (FRET) oder Fluoreszenzkreuzkorrelationsspektroskopie (FCCS), 2) die Manipulation von zellulären Proteinspiegeln (durch Überexpression oder Knock-down) und 3) die Immunopräzipitation von Proteinkomplexen aus Zelllysaten.^[1] Ferner werden zurzeit Proteininteraktionkarten (Interakome) mithilfe biochemischer Methoden auf Proteomebene hergestellt (z.B. mittels Yeast-2-Hybrid-Verfahren, Proteinarrays und affinitätsbasierten Reinigungstechniken verknüpft mit Massenspektrometrie).^[2] In allen Fällen ist die Fülle an detektierbaren neuen Interaktionen auf recht starke PPI begrenzt. Der Datensatz bedarf zusätzlich der Charakterisierung und Validierung durch komplementäre Methoden.

Eine Möglichkeit zur Verbesserung der Analyse ist die Verwendung von kleinen Molekülen, d.h. Verknüpfern (cross-linker) oder chemischen Induktoren zur Dimerisierung (chemical inducers of dimerization, Dimerisierer, CIDs)

(Abbildung 1),^[3] um die Lebensdauer von Proteinkomplexen zu erhöhen und zu helfen, die Funktionalität von PPI zu zeigen. Generell werden zwei Ansätze verfolgt: kovalente Fixierung existierender PPI über chemische Verknüpfung oder Induktion der PPI über nicht-kovalente chemische Dimerisierer. In beiden Fällen werden die zu untersuchenden Proteine auf stabile Weise verknüpft, reversibel oder irreversibel. Diese Techniken können verwendet werden, um Proteinaktivität oder -lokalisierung zu kontrollieren oder den Oligomerisierungszustand von Proteinen zu beeinflussen.

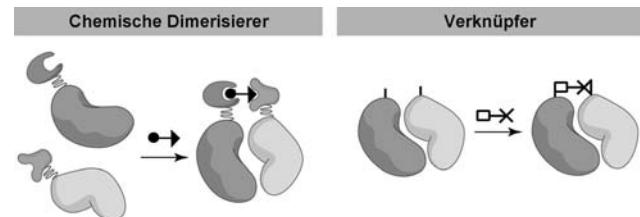


Abbildung 1. Die Konzepte hinter Verknüpfern und chemischen Dimerisierern (CIDs). CIDs werden verwendet, um unter Bildung eines ternären Komplexes zwei Zielproteine künstlich zusammenzuführen. Verknüpfen detektieren existierende Protein-Protein-Interaktionen. Dazu binden sie kovalent und spezifisch an funktionelle Gruppen der Zielproteine.

Hier stellen wir die verfügbaren chemischen Induktoren zur Dimerisierung sowie chemische Verknüpfung vor und zeigen Beispiele ihrer Anwendungen zur Untersuchung von Signalübertragung, Genexpression oder Proteinsekretion. Ferner werden neue Strategien diskutiert, die in Zukunft zu neuen Werkzeugen und breiteren Anwendungen führen.

[*] Dr. A. Rutkowska, Priv.-Doz. Dr. C. Schultz

Cell Biology & Biophysics Unit
European Molecular Biology Laboratory
Meyerhofstraße 1, 69117 Heidelberg (Deutschland)
E-Mail: schultz@embl.de

2. Anwendungsspektrum chemischer Verknüpfer

Chemische Induktoren zur Dimerisierung (CIDs) besitzen zwei Bindungssoberflächen, die gleichzeitig die gleiche (Homodimerisierer) oder zwei verschiedene (Heterodimerisierer) Proteindomänen binden (Abbildung 2).^[3] Obwohl nicht kovalent, ist die Dimerisierungsreaktion meist sehr spezifisch, hoch effizient und stabil. In der Tat sind sie in den meisten Fällen irreversibel. Daher können praktisch alle Proteine, die mit den zusätzlichen Domänen versehen sind, in direkten Kontakt gebracht werden. Falls die CIDs membrangängig und metabolisch stabil sind, können Proteininteraktionen in lebenden Zellen mit räumlicher Kontrolle und quasi in Echtzeit erzeugt werden.

Homodimerisierer werden verwendet, um Zellvorgänge zu steuern, die auf der Selbstassoziation von Proteinen beruhen. Das wohl beste Beispiel ist die induzierte Aktivierung von Zelloberflächenrezeptoren in Abwesenheit von extrazellulären Liganden (Abbildung 2A).^[4]

Heterodimerisierer ermöglichen prinzipiell die spezifische und unabhängige Kontrolle aller gegebenen Zellfunktionen, die auf Proteininteraktionen beruhen (Abbildung 2B). Zu den häufigsten Anwendungen gehört die rasch induzierte Translokation eines Proteins zu seiner gewünschten Aktivitätsstelle^[5] sowie die transkriptionelle Aktivierung von Genen.^[6] Hohe Geschwindigkeit und Selektivität sind die größten Vorteile dieser auf kleinen Molekülen basierten Systeme, wenn man sie mit genetischen Manipulationswerkzeugen wie RNAi oder Tetracyclin-induzierter Expression vergleicht. Daher sind Heterodimerisierer wesentlich für die Dreifach-Hybridtechnik (three-hybrid technique), die die Untersuchung von Interaktionen zwischen kleinen Molekülen und Zielproteinen in lebenden Zellen, zumeist in Hefe (Y3H), im Hochdurchsatzverfahren ermöglicht.^[7] Eine verwandte Version heißt „chemical complementation“ und erlaubt, im Hochdurchsatz nach Enzymaktivitäten zu suchen.^[8]

Eine weitere interessante Dimerisierungsvariante basiert auf einem umgekehrten System, bei dem das Zielprotein durch die Oligomerisierungseigenschaften der eingefügten Domäne in Aggregate verpackt ist (Abbildung 2C). Zugabe des Liganden (genannt inverser Dimerisierer, reverse dimerizer) ermöglicht die schnelle Deaggregierung des Fusionsproteins und Rekonstituierung der Aktivität. Diese Methode kann z.B. dazu verwendet werden, die intrazelluläre Pro-

teinwanderung durch die Induzierung von Proteinsekretion zu untersuchen.^[9] Eine ähnliche Anwendung benutzt heterodimere Verbindungen, die nach Bindung an die angefügten Domänen die PPI destabilisieren, indem sie die Interaktionsoberfläche zudecken oder andere Strukturveränderungen herbeiführen. Dies kann genutzt werden, um Enzyminhibitoren zu finden,^[10] chemische Selektivität zu erzeugen (indem CIDs verwendet werden, die spezifische Zellaktivitäten zeigen),^[10,11] oder um nicht-native Proteininteraktionen herbeizuführen, um z.B. Proteinaggregation zu verhindern.^[12]

Weitere Variationen der CID-Technik führen zu Werkzeugen zur posttranslationalen Kontrolle von Proteinspiegeln durch Deaktivierung (kontrollierter Abbau) oder Aktivierung (kontrollierte Stabilisierung oder induziertes Proteinsplicing). Zum Beispiel wird das Zielprotein in Abwesenheit eines CID rasch proteolytisch abgebaut, wenn eine künstliche Domäne mit Destabilisierungseigenschaften oder eine sogenannte Degron-Sequenz eingeführt wurde. Dieser Prozess kann rasch moduliert werden, indem ein Dimerisierer zugegeben wird, der entweder selbst stabilisiert^[13] oder zur Entfernung^[14] der Abbau-induzierenden Domäne führt. Auf diesem Wege wird die Stabilität und damit die Funktion des Zielproteins wieder hergestellt. Weitere Wege, den Proteinabbau zu kontrollieren, basieren auf der induzierbaren Lokalisierung des Zielproteins zur E3-Ubiquitinligase^[15] oder zum Proteasom.^[16] Kleine Moleküle werden auch verwendet, um Proteinsplicing zu initiieren und zu kontrollieren. Dies führt zu neuen Proteinvarianten mit spezifischen Funktionen.^[17]

3. Dimerisierer – die Moleküle

Das Konzept der chemisch induzierten Dimerisierung wurde ursprünglich durch die natürlich vorkommende immunosuppressive Substanz FK506 inspiriert. FK506 bindet simultan und mit hoher Affinität sowohl das kleine zytoplasmatische Protein FKBP (FK506-bindendes Protein 12) als auch die Phosphatase Calcineurin.^[18] Als Alternative zu natürlichen difunktionellen Substanzen können zwei Proteinbinder in einem Molekül mit einem flexiblen Abstandhalter verknüpft werden (Abbildung 3, Tabelle 1). Dieser Typ wird



Carsten Schultz promovierte im Fach Chemie an der Universität Bremen (AK Bernd Jastorff). Nach einem Postdoc-Aufenthalt bei Roger Tsien an der University of California, San Diego, habilitierte er in Organischer Chemie an der Universität Bremen. Nach einer weiteren Station am MPI in Dortmund ging er 2001 als Gruppenleiter ans Europäische Molekularbiologische Labor (EMBL) in Heidelberg. Seit 2008 ist er dort Senior Scientist. Seine Forschungsinteressen zielen auf ein besseres Verständnis intrazellulärer Signalnetzwerke ab. Um dieses Ziel zu erreichen, entwickelt die Arbeitsgruppe Methoden, um intrazelluläre Abläufe visualisieren und manipulieren zu können.



Anna Rutkowska promovierte auf dem Gebiet der Proteinfaltung an der Universität Heidelberg bei Bernd Bukau. Zurzeit arbeitet sie am EMBL Heidelberg als interdisziplinärer Postdoc (EIPOD) in den Gruppen von Christian Häring, Jan Ellenberg und Carsten Schultz. Ihre Arbeiten konzentrieren sich auf neue Methoden, um Protein-Protein-Interaktionen in lebenden Zellen zu untersuchen und auf diese Weise relevante biologische Fragen beantworten zu können.

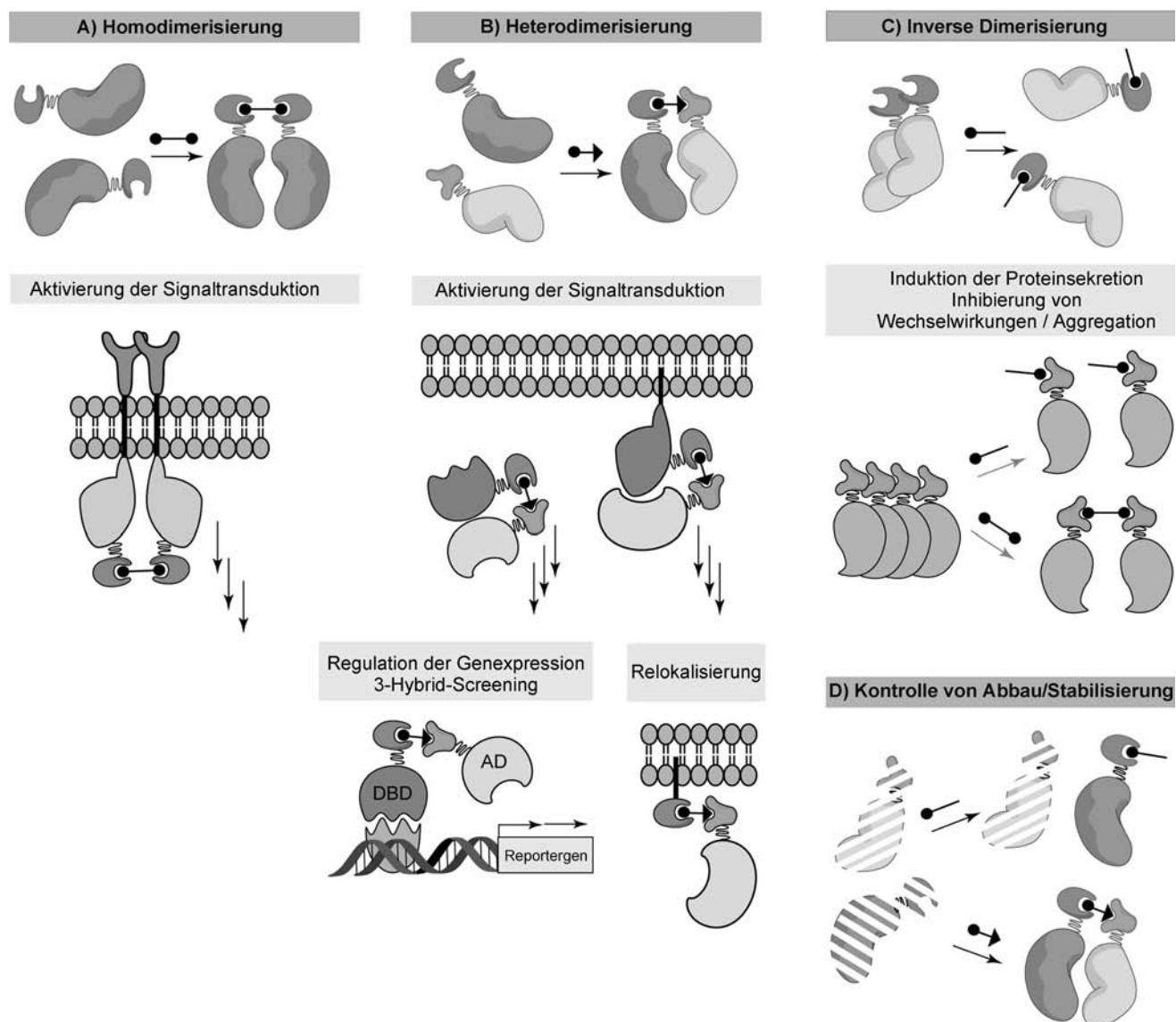


Abbildung 2. Allgemeine Wirkweisen chemischer Dimerisierer (CID). A) Symmetrische Liganden (Homodimerisierer) verknüpfen zwei Moleküle des gleichen Proteins. Diese Methode wird verwendet, um Prozesse wie die Selbstdimerisierung von Proteinen zu untersuchen, wie z. B. beim Aktivieren von Signalkaskaden durch Rezeptordimerisierung in der Abwesenheit eines Liganden.^[20] B) Nichtsymmetrische Liganden (Heterodimerisierer) verknüpfen zwei verschiedene Proteine. Diese Werkzeuge werden verwendet, um einzelne Schritte in Signalnetzwerken zu untersuchen, die Lokalisierung von Proteinen zu kontrollieren oder um Genexpression zu induzieren. Ferner sind sie Bestandteil von Dreifach-Hybridsystemen um nach kleinen bindenden Molekülen oder bindenden Oberflächen im Hochdurchsatz zu suchen. In dem Fall werden die Bindedomänen mit DNA-bindenden Proteinen (DBD) und einem Transkriptionsaktivator (AD) fusioniert. C,D) Derivate von CIDs und ihren Bindedomänen, z. B. „inverse Dimerisierer“ oder Destabilisierungsdomänen werden gebraucht, um Proteinstabilität oder Löslichkeit zu regulieren, Proteinsekretion auszulösen oder Protein-Protein-Interaktionen durch Blockierung vorhandener oder Schaffung neuer Interaktionsoberflächen zu inhibieren.

üblicherweise von wohlcharakterisierten Ligand-Rezeptor-Paaren oder Enzym-Substrat-Interaktionen erhalten.

3.1. Homodimerisierer

Die ersten Homodimerisierer wurden durch die Gruppen von Schreiber und Crabtree vorgestellt und bestanden aus einem dimeren FK506-Liganden, genannt FK1012, der zwei FKBP-Proteine binden konnte.^[18] Bis heute wurde ein ganzes Spektrum an FK1012-Varianten mit verbesserter konforma-

tiver Rigidität, höherer Spezifität und reduzierter Affinität für andere endogene Proteine synthetisiert (SLF, synthetischer Ligand für FKBP, z. B. AP1510 oder AP20187).^[19] Zudem wurde die FKBP-Domäne modifiziert, um die Affinität für SLF zu erhöhen (z. B. die Mutante FKBP F36V). Die optimierten Systeme sind kommerziell erhältlich und wurden erfolgreich eingesetzt, um eine Anzahl von Signalübertragungsabläufen in intakten Zellen zu aktivieren.^[20]

Ein weiterer prominenter Homodimerisierer ist Coumermycin (Abbildung 3), das die N-terminalen Domänen (220 Aminosäuren) der bakteriellen Protein-DNA-Gyrase B

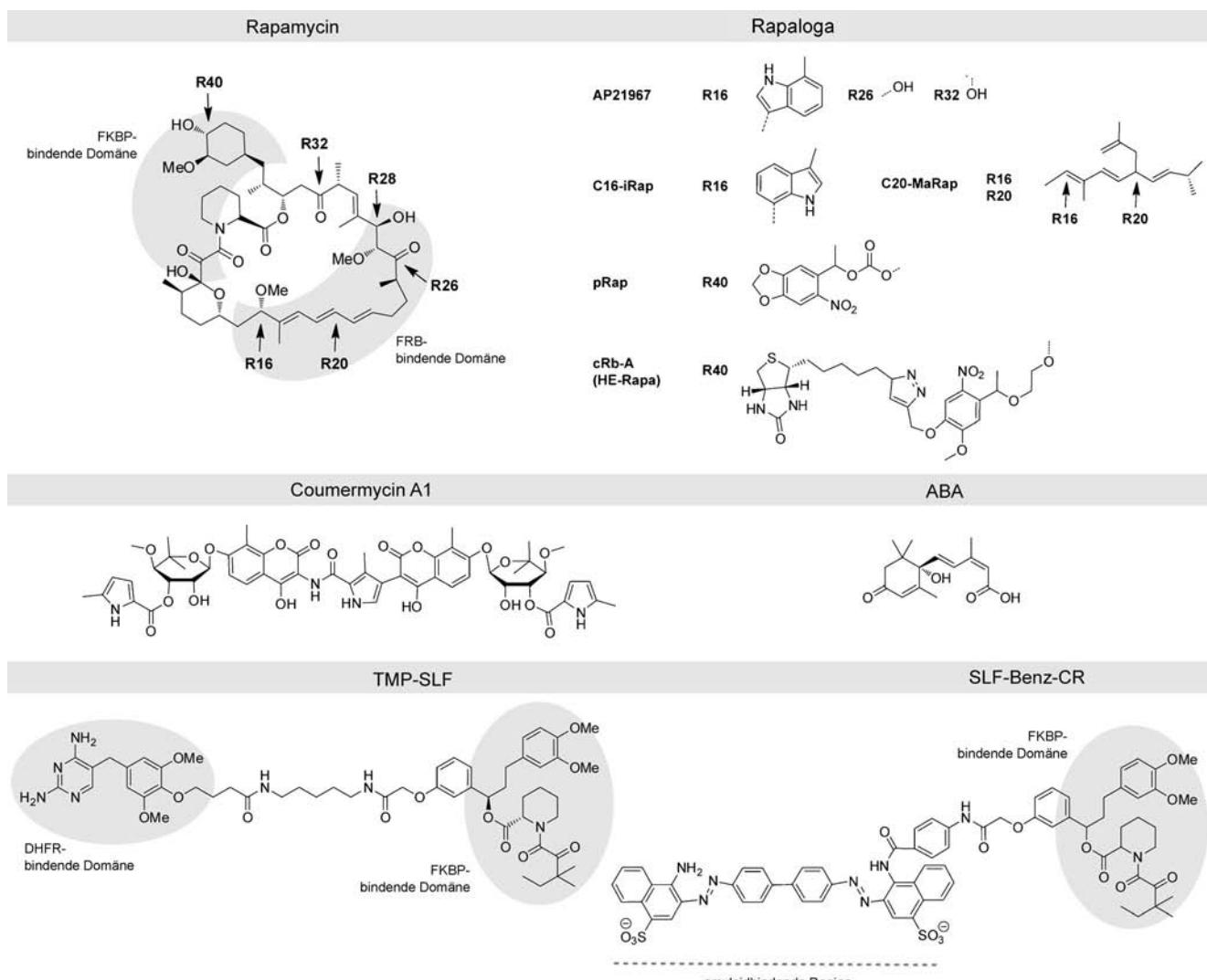


Abbildung 3. Beispiele von chemischen Dimerisierern (CIDs): Der meistverwendete natürliche Heterodimerisierer Rapamycin und seine synthetischen Analoga (Rapaloga). pRap und cRb-A sind photoaktivierbare Derivate; der natürliche Homodimerisierer Coumermycin wechselwirkt mit bakterieller DNA-Gyrase B; das Pflanzenhormon Abscisinsäure (ABA) als Heterodimerisierer induziert die Interaktion zwischen zwei Proteinen (PY1, AB1). Beide sind in ABA-induzierten Stresssignalwegen in Pflanzen wichtig; der Heterodimerisierer TMP-SLF enthält ein synthetisches Substrat für DHFR- sowie eine FKBP-bindende Domäne; der Heterodimerisierer SLF-Benz-CR konjugiert FKBP an Aβ-Dimere oder kleine Oligomere (über den Kongorot-Farbstoff) und inhibiert so die Amyloidaggregation.

(GyrB) verknüpft.^[21] Interessanterweise kann ein anderes kleines Molekül, Novobiocin, das nur mit einer der GyrB-Untereinheiten interagiert, verwendet werden, um die Coumermycin-getriebene Verknüpfung zu lösen. Sowohl Coumermycin als auch Novobiocin sind kommerziell erhältlich und sind nicht toxisch, da GyrB keine Funktion in höheren Eukaryoten besitzt. Das System wurde erfolgreich eingesetzt, um Signalwege zu aktivieren (z.B. Raf/Ras oder Jak/Stat),^[4a,22] verschiedene membranständige Rezeptoren zu dimerisieren,^[23] die Funktion der Proteindimerisierung zu untersuchen^[24] und Genexpression zu kontrollieren.^[25] Eine weitere wichtige Anwendung nutzt synthetische Analoga des Coumermycins mit veränderter Spezifität.^[26] Sie dimerisieren das endogene Hitzeschockprotein Hsp90 und zeigen so antiproliferative Wirkung gegen Brust- und Prostatakrebszelllinien.

Ein drittes wichtiges System basiert auf Methotrexat (MTX), einem Inhibitor der Dihydrofolatreduktase (DHFR).^[27] Der bisMTX-Dimerisierer mit zwei MTX-Molekülen, die über eine flexible Brücke verbunden sind, wurde bisher meist in zellfreien Systemen eingesetzt, um Nanoaggregate und Nanoringstrukturen zu erzeugen.

3.2. Heterodimerisierer

Der populärste Heterodimerisierer basiert auf dem difunktionellen Naturstoff Rapamycin, der simultan die sonst nicht interagierenden Protein FKBP und die FRB-Domäne (FKBP-Rapamycin-bindende Domäne) der Proteinkinase FRAP/mTOR bindet (Abbildung 3).^[28] Die Arbeiten zu Rapamycin und seinen synthetischen Derivaten (Rapaloga)

Tabelle 1: Verfügbare Methoden zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen: Dimerisierer.

Chemische Induktoren zur Dimerisierung/Dimerisierer		Zusätzliche Domänen/Markierungen		Größe [kDa]	Bemerkungen	in vivo	Lit.
Homodimerisierer							
FK1012	FK506-Dimer	FKBP		12		+	[18]
SLF z. B.: AP1510	synthetische FKBP-Liganden	FKBP		12	potenter, senken immuno-suppressive Aktivität	+	[29a]
AP1903	ausbuchtende Analoga von AP1510	FKBP F36V		12	keine Interaktion mit endogenen FKBP	+	[19a, 29a]
(CsA)2	Cyclosporin-A-Dimer	Cyclophilin (CyP)		21	keine Interaktion mit T-Zell-Signalweg	+	[63]
BisMTX Coumermycin	Methotrexat-Dimer Naturstoff	eDHFR/mDHFR Gyrase B (GyrB)		18 24	Nanoaggregate 2–220 N-terminale aa	? +	[27] [21]
Inverse Dimerisierer							
AP21998	ausbuchtender Ligand, analog zu einer Hälfte von AP1903	FKBP F36M		12	Ligand unterbricht Selbstdimerisierung von FKBP-Mutanten	+	[9]
Heterodimerisierer							
Rapamycin <i>Rapaloga:</i>	Naturstoff	FKBP	FRB	12/11		+	[28]
AP21967	synthetische, ausbuchtende Analoga von Rapamycin	FKBP	FRB T2098L	12/11	verringerte Interaktion mit endogenen FRB	+	[29, 13b]
C20-MaRap		FKBP	FRB PLF (KLF, KTF)	12/11	gute pharmakologische Eigenschaften, Destabilisierung von FRB	+	[13a]
C16-iRap		FKBP	FRB PLF (KLF, PLW)	12/11	keine guten pharmakologischen Eigenschaften, Destabilisierung von FRB	+	[13a]
pRap	photoaktivierbares Analogon	iFKBP	FRB	12/11	kürzere Version von FKBP	+	[34b]
cRb-A	photoaktivierbares Analogon	FKBP	FRB	12/11	Konjugat mit Biotin, nach Spaltung wird HE-Rapa freigesetzt	+	[34a]
FK506-DEX	FK506 und Dexamethason	FKBP	GR	12/32	Y3H-System	+	[64]
FKCsA	FK506-CsA-Dimer	FKBP	CyP	12/21		+	[65]
MTX-DEX	Methotrexat oder Trimethoprim	DHFR	GR	18/32	Y3H-System	+	[36]
TMP-DEX	und Dexamethason						
MTX-SLF	Methotrexat und ein synthetischer FKBP-Ligand	DHFR	FKBP	18/12	Bakterien- und Y3H-System	+	[10, 11, 37a]
TMP-SLF	Trimethoprim und SLF	eDHFR	FKBP	18/12	keine endogenen Proteintargets	+	[37b]
MTX-BG	Methotrexat und ein Benzylguaninderivat	DHFR	SNAP-tag	18/20	Y3H-System mit kovalenter Ein-Domänen-Bindung	+	[40]
DEX-Biotin		GR	Streptavidin	18/52	kovalente Ein-Domänen-Bindung	+	[38b]
Estradiol-Biotin		Streptavidin	Estrogenrezeptor	52/29	Y3H-System mit kovalenter Ein-Domänen-Bindung	+	[38a]
ABA	S-(+)-Abscisinsäure	PYL _{CS}	ABI _{CS}	20/33	pflanzenabgeleitet, stabil, ungiftig, gute Pharmakokinetik	+	[35]
SLF-Benz-CR	synthetischer FKBP-Ligand und Kongorot	FKBP	A β -Dimere/Oligomere	12/x	inhibiert Amyloidaggregation	+	[12]
Lichtaktivierte Dimerisierer							
Lichtquelle	Zusätzliche Domänen/Markierungen		Größe [kDa]	Bemerkungen		in vivo	Lit.
Rot (650 nm)	PhyB	PIF6	99/11	sehr schnell, fernes Rot (750 nm) induziert Dissoziation, benötigt Cofaktor PCB		+	[41]
Blau (450 nm)	FKF1	GIGANTEA (GI)	70/125	langsam (0.5 h), irreversibel		+	[42]
Blau (488 nm)	CIBN	CRY2	20/70	sehr schnell, spontane Dissoziation (min)		+	[43]

mit reduziertem Einfluss auf die endogene Zellbiologie sind kürzlich ausführlich in Übersichtsartikeln beschrieben worden und werden hier nicht im Detail behandelt (siehe jedoch Tabelle 1).^[29] Einige der herausragenden Anwendungen sind die Veränderung von Phosphoinositidspiegeln,^[30] den GTP-ase-Signalwegen,^[5a] G-Protein-gekoppelten Rezeptorsignalen,^[31] Sekretion^[32] oder Glycosylierung.^[33] Besonders spannend sind neueste Entwicklungen zu photoaktivierbaren Rapamycinderivaten, mit denen die lichtinduzierte Aktivierung von PPI möglich wird (Abbildung 3, Tabelle 1).^[34]

2011 wurde ein weiterer natürlich vorkommender Heterodimerisierer vorgestellt, das Pflanzenhormon *S*-(+)-Abscisinsäure (ABA) (Abbildung 3).^[35] Dieses sehr kleine und leicht zugängliche Molekül induziert die Dimerisierung von Proteinen, die an Entwicklungsentscheidungen und der Stressantwort in Pflanzen beteiligt sind, vor allem die PYL1-Domäne (PYL_{CS}) der regulatorischen Domäne des ABA-Rezeptors (PYR/PYL/RCAR) und die ABI1-Domäne (ABI_{CS}) der ABI1-Proteinserin/threoninphosphatase (PP2C). ABA ist nicht toxisch, hat keine Wirkung auf Signalwege in Säugerzellen und zeigt günstige Pharmakokinetiken in der Maus. Der Vergleich mit Rapaloga zeigte eine hohe Stabilität, eine lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung, rasche Effekte und schnelle Reversibilität in Mausstammzellen.^[35] Um toxische Effekte auszuschließen, wurde eine mutierte ABI_{CS}-Domäne erzeugt, die eine reduzierte Phosphataseaktivität zeigte (ABI_{D143A}).^[35] Obwohl vielversprechend, stehen die biologischen Anwendungen noch aus.

Andere Typen von Heterodimerisierern wurden durch die Fusion von zwei Liganden oder Enzymsubstraten generiert. Die Arbeitsgruppe um Cornish entwickelte heterodifunktionelle Moleküle, die den DHFR-Liganden MTX bzw. das weniger toxische Trimethoprim (TMP) sowie Dexamethason (DEX) enthielten.^[36] Diese Moleküle erlaubten rasche Dimerisierung von DHFR und einem Glucocorticoidrezepstor (GR)-Fusionsprotein und wurden vorwiegend in bakteriellen und Y3H-Systemen verwendet.^[36] Ähnliche Heterodimere zwischen MTX/TMP und dem synthetischen FKBP-Liganden SLF (Abbildung 3) wurden verwendet, um post-transkriptionale Modifikationen von Proteinen zu ändern^[37] oder um umgebungsabhängige Aktivitäten zu erzeugen. Im zweiten Fall wurde ausgenutzt, dass wegen der kurzen Brücke die simultane Bindung von DHFR und FKBP unmöglich war.^[10,11] Ein weiterer „spezialisierter“ Dimerisierer verwendete den synthetischen FKBP-Liganden SLF verknüpft mit dem Farbstoff Kongorot (SLF-Benz-CR, Abbildung 3). Das Molekül induzierte die Fusion zwischen FKBP-Molekülen und Dimeren oder kleinen Oligomeren des A β -Peptids.^[12] Die Bildung dieser neuen Komplexe verhinderte eine weitere Interaktion mit A β und blockierte daher Amyloidaggregation.

Eine letzte Gruppe von CIDs basiert auf quasi-kovalenten irreversiblen Interaktionen. Dabei wird die Spezifität und die Stabilität des Komplexes so erhöht, dass PPI gezielt mit Standardmethoden der Molekularbiologie wie z. B. dem Immunoblotting untersucht werden können. Anfänglich wurde der natürliche Ligand Biotin und Fusionsproteine mit Streptavidin eingesetzt. Zwei verschiedene Heterodimerisierer wurden synthetisiert: DEX-Biotin (für GR- und Streptavi-

dinfusionskonstrukte, besonders effektiv in Säugerzellen) und Estradiol-Biotin (für Estrogenrezzeptor- und Streptavidinfusionskonstrukte, besonders effektiv in Y3H-Screens).^[38] In Anwesenheit einer BirA-Biotinligase fungiert Biotin auch selbst als Heterodimerisierer der Streptavidin- und AviTag-Fusionsproteine.^[39] Ein weiteres Dimerisierungssystem wurde von Johnsson und Mitarbeitern vorgestellt.^[40] Sie nutzten die O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (AGT), auch SNAP-tag genannt, die kovalent O⁶-Benzylguanin(BG)-Derivate über eine Cysteinseitenkette in ihrer aktiven Tasche bindet (Abbildung 4). Um den Heterodimerisierer zu erzeugen, wurde das BG-Derivat mit MTX verknüpft und so eine kovalente und eine hochaffine nichtkovalente Verknüpfungsstelle bereitgestellt.^[40] Eine Erweiterung dieses Ansatzes ergab eine Reihe von Molekülen, die zwei kovalente Bindungen erzeugten. Diese gehören aber eher in die Verknüpfert-Kategorie und werden weiter unten vorgestellt.

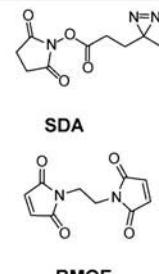
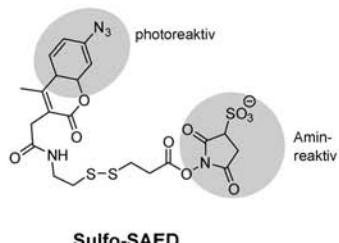
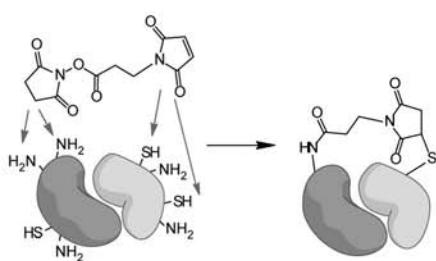
4. Lichtinduzierte Proteininteraktionen

Die oben beschriebenen CIDs finden weite Anwendung in der Zellbiologie, und viele biologische Fragen konnten mit ihnen bearbeitet werden. Allerdings besteht weiterhin der Nachteil, dass die kleinen Moleküle die Plasmamembran überwinden müssen und möglicherweise Nebeneffekte erzeugen. Außerdem lässt die Methode räumliche und temporale Auflösung bei Einzelzellexperimenten und im Gewebe vermissen. Um das zu umgehen, wurden kürzlich Techniken entwickelt, PPI über Licht zu kontrollieren. Die entsprechenden genetisch kodierten Dimerisierer basieren auf dem Photorezeptor der Pflanze *Arabidopsis thaliana* und können spezifisch, kurzfristig und reversible PPIs induzieren (Tabelle 1).

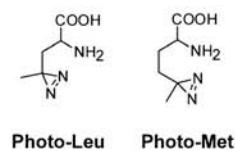
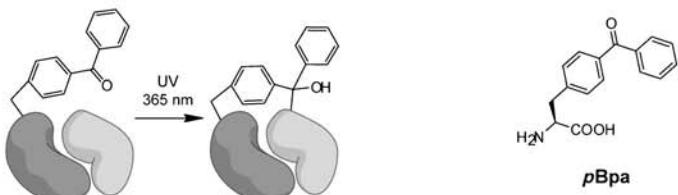
Eines dieser Systeme verwendet Phytochrom B (PhyB) und einen Transkriptionsfaktor, Pytochrom-Interaktionsfaktor 6 (PIF6).^[17b,41] Die Assoziations- und Dissoziationskinetiken des PhyB-PIF6-Komplexes werden mit rotem (650 nm) bzw. infrarotem Licht (750 nm) gesteuert. Diese Wechselwirkung benötigt allerdings noch den extrazellulär zuziebenden Cofaktor Phycocyanobilin (PCB) und ist daher nicht völlig frei von chemischer Manipulation. Eine alternative Technik, genannt lichtaktivierte Dimerisierung (LAD), wurde von der Arbeitsgruppe Dolmetsch entwickelt, bei der wechselwirkende Proteindomänen des Proteins FKF1 und dessen Interaktionspartner GIGANTEA (GI) eingeführt wurden.^[42] Diese Methode bedarf keiner exogenen Liganden, aber die Blaulicht-induzierte Dimerisierung ist langsamer und anhaltend, also quasi irreversibel. Der bisher vielversprechendste Blaulicht-induzierte Dimerisierer besteht aus der N-terminalen Domäne von Protein CIB1 (CIBN) und Cryptochrom 2 (CRY2).^[43] Dieses System vermeidet alle zuvor genannten Nachteile, d. h., es wird kein exogener Chromophor benötigt, und die Kinetiken sind schnell und spontan reversibel.

Obwohl alle drei Techniken *in vivo* anwendbar sind und räumliche und temporäre Präzision versprechen, stehen biologische Anwendungen noch aus. Zudem teilen alle Proben den Nachteil, dass mindestens eine der Domänen mit ca.

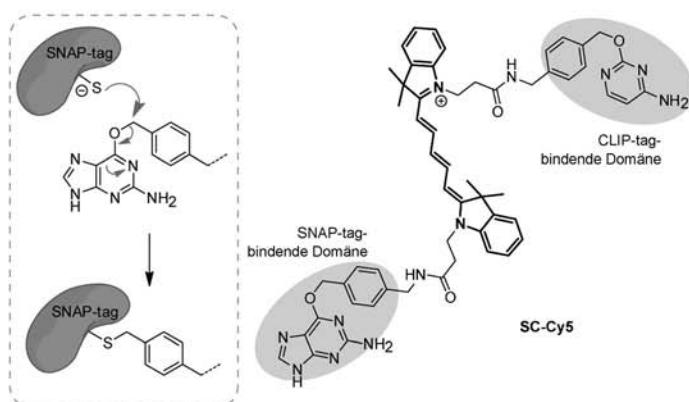
chemische, ortsspezifische Verknüpfer



genetisch kodierte, photoreaktive Verknüpfer



S-CROSS



xCrAsH

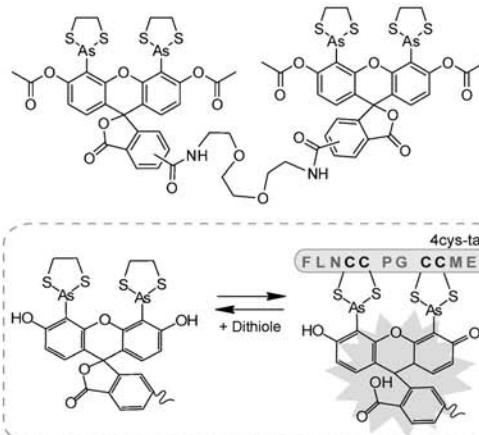


Abbildung 4. Beispiele von chemischen Verknüpfern inklusive solchen mit Merkmalen von Dimerisierern. Kommerziell erhältliche regiospezifische homo- und heterodifunktionelle Verknüpfen, die mit primären Aminen (SDA), Sulfhydrylgruppen (BMOE) oder anderen funktionellen Proteingruppen reagieren; einige enthalten photoreaktive nicht-selektive Gruppen, die nach Bestrahlung mit der nächsten verfügbaren C-H- oder N-H-Bindung (Sulfo-SAED, SDA) reagieren; genetisch kodierte, photoreaktive Verknüpfen in Form von nichtnatürlichen Aminosäuren, die an einer bestimmten Stelle (pBpa) oder unspezifisch an vielen Positionen (Photo-Leu, Photo-Met) eines Proteins eingeführt werden können; das S-CROSS-System basierend auf der kovalenten Verknüpfung zwischen SNAP- und/oder CLIP-markierten Proteinen, die durch einen Fluorophor in der Brücke sichtbar gemacht werden kann. Dies ist zurzeit nur *in vitro* möglich; der reversible Verknüpfer xCrAsH, der Proteininteraktionen von Proteinen mit einem kurzen Peptidmotiv (4cys-tag) in lebenden Zellen detektieren kann.

100 kDa sehr groß ist. Dies könnte einen negativen Einfluss auf die biologische Aktivität der Zielproteine haben. Daher sind diese Methoden wahrscheinlich am besten geeignet, Proteinlokalisierungen zu kontrollieren.

5. Verknüpfer zur Messung und Fixierung von Proteininteraktionen

Während Dimerisierer verwendet werden, um künstlich PPIs zu beeinflussen, sind Verknüpfungsmethoden mehr für die Detektion und das Verfolgen von PPIs in Zellen geeignet. Die Technik ist besonders nützlich, um schwache und transiente Interaktionen zu identifizieren, die sich anderen Me-

thoden entziehen. Verknüpfen sind ähnlich wie Dimerisierer kleine Moleküle, die zwei verschiedene (hetero-difunktionell) oder zwei gleiche (homo-difunktionell) reaktive Gruppen tragen, die in der Lage sind, spezifische funktionelle Gruppen oder fusionierte Markierungen am Zielprotein zu binden (Abbildung 4, Tabelle 2). Diese kovalente Reaktion kann sowohl reversibel als auch irreversibel sein. Sie kann die unterschiedlichsten Spezifitäten zeigen, vom einfachen chemischen Verknüpfer bis hin zu hochspezifischen Dimerisierer-basierten Methoden.

Die üblichen kommerziell erhältlichen Proteinverknüpfungschemikalien sind homo- oder heterodifunktionelle Reagenzien, die mit Amino-, Sulfhydryl- oder Carboxygruppen auf der Proteinoberfläche reagieren (Abbildung 4, Ta-

Tabelle 2: Verfügbare Methoden zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen: chemische Verknüpfer.

Art von Verknüpfer	Reaktive Gruppen/Markierungen	Größe	Bemerkungen	in vivo	Lit.
		[kDa]			
chemisch, z. B.:					
BMOE, DTEM	Sulphydryl-reaktiv		homodifunktionell, Maleimide	+/-	[44]
DSG, DSP, EGS	Amin-reaktiv		homodifunktionell, NHS-Ester	+/-	[44]
SDA, Sulfo-SAED	Amin-reaktiv/nichtselektiv, lichtaktiviert		heterodifunktionell, NHS-Ester/Diazirin oder Arylazid	+/-	[44]
genetisch kodiert:					
pBpa	nichtselektiv		kovalent, nicht reversibel	+	[46]
Photo-Leu, Photo-Met	nichtselektiv		kovalent, nicht reversibel	+	[47]
CoDi1 (2,3)	SNAP-tag	SNAP-tag	20	kovalent, nicht reversibel, induziert Dimerisierung	[50a,b]
S-CROSS:					
SC-Cy5	SNAP-tag	CLIP-tag	20/21	kovalent, nicht reversibel, Fluoreszenzdetektion	-
SS-Cy5, SS-Cy3	SNAP-tag	SNAP-tag	20		
xCrAsH	4cys-tag	4cys-tag	1	kovalent, reversibel, kleine Markierung	[51]
FIAsH, ReAsH	gespaltener 4cys-tag		>1	kovalent, reversibel, spezieller Entwurf nötig	[54]
DOPA-Biotin-FIAsH	Nucleophile	4cys-tag	1	kovalent, reversibel, Biotintransfer	[55]
TRAP	nichtselektiv	4cys-tag	1	kovalent, reversibel, Fluorophortransfer	[56]

belle 2).^[44] Obwohl sehr nützlich und häufig in vitro verwendet, fehlt ihnen die geeignete Reaktivität und Spezifität in lebenden Zellen. Die besten Resultate werden heutzutage mit heterodifunktionellen photoreaktiven Verknüpfern wie Sulfo-SAED erzielt (Abbildung 4), die eine zweistufige Reaktion anwenden (zuerst Reaktion mit einer funktionellen Gruppe, nach Lichtaktivierung eine zweite nicht-selektive Reaktion mit der räumlich nächsten C-H- oder N-H-Bindung).^[45]

Um die Spezifität zu erhöhen, wurden verschiedene alternative Methoden entwickelt, z. B. 1) Aminosäure-spezifische Photoverknüpfen an definierten Positionen im Protein oder 2) spezielle Proteinmarkierungen, die nach PPI mit Photoverknüpfen oder anderen chemischen Einheiten wie Biotin reagieren können (so genannte Markierungsübertragungstechniken) (Abbildung 4, Tabelle 2). Die erste Methode basiert auf dem Einbau von genetisch kodierten Photoverknüpfen durch künstliche Aminosäuren (z. B. *p*-Benzoyl-L-phenylalanin, *p*Bpa), die an einer definierten Position durch die Verwendung des erweiterten genetischen Codes durch Amber-Stopcodon-Unterdrückung eingeführt werden.^[46] Alternativen sind photoaktivierbare Aminosäuren (Photoleucin und Photomethionin, Abbildung 4), die anstelle der entsprechenden natürlichen Aminosäuren durch die unmodifizierte Translationsmaschinerie eingebaut werden.^[47] Verglichen mit den traditionellen chemischen Verknüpfern profitieren die neuen Methoden durch eine ähnliche Effizienz und erhöhte Spezifität. Entsprechend wurden diese Verknüpfen kürzlich erfolgreich eingesetzt, um PPIs in lebenden Zellen zu untersuchen. Auf ähnliche Weise verwenden Markierungsübertragungstechniken modifizierte Ligasen (z. B. die bakterielle Liponsäure-Ligase, LpA), die die kovalente Konjugation diverser Proben mit einer speziellen Proteinmarkierung katalysiert. Solche Reaktionen werden vorwiegend verwendet, um PPIs zu detektieren, da die Markierung üblicherweise interagierende Partner nicht verknüpft.^[48] Eine Methode allerdings verwendet die LpA-Mutante, um das Zielprotein spezifisch mit einer fluorierten Arylazid-Photoaffinitätssonde

zu markieren.^[49] Die Methode gestattet sehr effizientes und robustes Markieren von Proteinen mit Photoverknüpfen, doch wurde sie bisher nicht eingesetzt, um biologische Fragen zu beantworten.

Durch die Verbindung der Dimerisierer- und Verknüpfermethoden entstand vor kurzem ein interessanter Methodensatz. Ähnlich den CIDs sind diese synthetischen Verknüpfermoleküle in der Lage, zwei Proteindomänen in den jeweiligen Zielproteinen gleichzeitig zu binden. Allerdings findet die Verknüpfung nur effizient statt, wenn die beiden Proteine sehr nah beieinander sind, d. h. miteinander interagieren. Eine von Johnsson und Mitarbeitern vorgestellte Methode verwendet die sich selbst markierenden Proteine SNAP-tag und CLIP-tag, beides Mutanten der humanen O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkylytransferase. Diese überlappen nicht in ihrer Substratspezifität und reagieren mit Benzylguanin(BG)- bzw. Benzylcytosin(BC)-Derivaten (Abbildung 4, Tabelle 2).^[50] Anfänglich wurden homodifunktionelle kleine Moleküle aus zwei BG-Derivaten mit einer flexiblen Brücke von verschiedener Länge verbunden (CoDi1, CoDi2, CoDi3).^[50a] Erste Experimente in lebenden Zellen zeigten, dass die Moleküle die Dimerisierung von zwei SNAP-tag-Fusionsproteinen abstandsabhängig erzeugten.^[50a] Damit verhalten sich diese Moleküle ähnlich wie CIDs. Eine Weiterentwicklung ist das S-CROSS-System,^[50b] das aus einem difunktionellen Verknüpfen aus BG- und/oder BC-Derivaten besteht, die mit einer Brücke, die einen Fluorophor zu Detektionszwecken enthält, verknüpft sind. S-CROSS erlaubt die selektive, gerichtete und kovalente Verknüpfung zweier interagierender Proteine, die Selektion zwischen starken und schwachen Interaktionen und Untersuchungen zur Stabilität von Proteinkomplexen. Mithilfe von verschiedenen homo- und heterofunktionellen Verknüpfen und Fluorophoren war es sogar möglich, verschiedene Interaktionspartner in einem Experiment zu analysieren. Leider wurde diese Technik bisher nur in Zellsäften angewendet. Ein weiterer Nachteil ist die Notwendigkeit, jedes Zielprotein mit einer recht großen

Domäne, die die Proteinaktivität beeinflussen kann, versehen zu müssen.

Um diese Nachteile zu umgehen, wurde in unserer Gruppe eine alternative Methode entwickelt, um die Detektion und Modulation von PPIs in lebenden Zellen zu ermöglichen.^[51] Diese neue Verknüpfungsmethode basiert auf der Bildung stabiler, kovalenter Komplexe zwischen einem dimeren Bisarsenylderivat (xCrAsH, ein homodifunktioneller Verknüpfer) und zwei Proteinen, die die Tetracysteinsequenz FLNCCPGCCMEP (4cys-tag) tragen (Abbildung 4, Tabelle 2).^[52] Drei wichtige Merkmale machen xCrAsH besonders attraktiv verglichen mit anderen Dimerisierern oder Verknüpfern: Reversibilität (durch Zugabe membrangängiger Dithiole), spezifische und effiziente Interaktionen in lebenden Zellen und die Verwendung sehr kleiner Peptide zur Markierung. Im Gegensatz zu größeren Domänen anderer Techniken, bildet 4cys-tag eine Proteinschlaufe, was die Wahrscheinlichkeit, die Zielproteinfunktion zu stören, stark reduziert, selbst wenn das Peptid in der Mitte der Sequenz eingebaut wird.^[53] Trotz dieser Vorteile sind weitere Verbesserungen notwendig. Insbesondere muss ein heterodifunktioneller Verknüpfer entwickelt werden, um Direktionalität und noch bessere Spezifität erzeugen zu können. Zudem wäre Fluorogenität der erfolgreichen Verknüpfung sehr vorteilhaft.

Neben xCrAsH wurden noch weitere auf Bisarsenylverbindungen basierende Verknüpfungsmethoden publiziert (Tabelle 2). ReAsH und FlAsH in Kombination mit einem gespaltenen Tetracysteinmotiv wurde zuvor verwendet, um den Oligomerisierungszustand von Proteinen sichtbar zu machen oder zwei Teile einer Proteinstruktur miteinander zu verbinden.^[54] Allerdings sind die Anwendungen dieser Technik begrenzt, weil die geteilten Proteinmotive für eine erfolgreiche Verknüpfung extrem dicht zusammenkommen müssen. Noch andere Systeme verwenden semi-spezifische, trifunktionelle Verknüpfer wie die DOPA-Biotin-FlAsH-Chimäre^[55] oder den Photoverknüpfer TRAP (targeted release affinity probe),^[56] der ebenfalls kovalent über ein Tetracysteinmotiv an das Zielprotein gebunden ist. Nach Oxidation mit Periodat oder Bestrahlung werden hier Interaktionspartner eingefangen und nachfolgend mittels Markierung identifiziert. Allerdings ist nur TRAP für lebende Zellen geeignet.^[56]

6. Weitere Wege

Das Gebiet der Dimerisierer und Verknüpfner hat sich rasch ausgebreitet und bietet nun ein etabliertes Repertoire an Werkzeugen an. Die Verwendung dieser kleinen Moleküle führte zur Zerlegung wichtiger zellulärer Abläufe in der Signalübertragung oder der Transkriptionsregulation. Zwar findet das etablierte FK506/Rapamycin-System weite Anwendung, doch wäre es wichtig, mehrere Proteinsysteme gleichzeitig und orthogonal regulieren zu können. Neben den Alternativen, die in diesem Kurzaufsatzz beschrieben sind, warten noch eine Reihe weiterer Molekül-Protein-Bindungsmotive darauf, als Werkzeug entdeckt zu werden. Dazu gehören bakterielle Enzyme (z. B. β -Lactamase),^[57] Proteine,

die über spontane intramolekulare Isopeptidbindungen stabilisiert werden (z. B. das SpyTag-System^[58]), Pflanzenproteine und ihre Liganden^[59] sowie künstliche Moleküle, die mit kurzen Motiven interagieren (z. B. das Boronsäurederivat RhoBo,^[60] andere Bisarsenylderivate wie AsCy3^[61] und viele mehr). Die kontinuierliche Verbesserung dieser Systeme wird nicht nur das Anwendungsspektrum erweitern, sondern vor allem zu besserer Biokompatibilität mit weniger Nebeneffekten in Zellen führen.

Die häufigste Hürde bei der Erzeugung intrazellulärer Verknüpfungen ist die Permeabilität der extrazellulär zugegebenen kleinen Moleküle. Ein weiterer kritischer Punkt ist die Auswirkung der Markierung (vor allem ihrer Größe) auf die Zielproteinfunktion und deren Expressionseffizienz. Hier haben genetisch kodierte, künstliche Aminosäuren z. B. als Photoverknüpfer das größte Potential. Allerdings sind diese nicht einfach in Säugerzellen zu verwenden, und Verbesserungen sind hier notwendig.^[62] Wegen des Größenproblems sind daher bisher kleine Peptidsequenzen wie das 4cys-tag bevorzugt. Große zusätzliche Domänen (siehe die Dimerisiersysteme) sind meist auf die N- oder C-Termini beschränkt, während kleinere Markierungen im Prinzip auch in interne Zielproteinabschnitte eingebaut werden können.^[53] Hier können kombinatorische Ansätze zur Modifizierung endogener Proteine in Säugerzellen hilfreich sein, um eine neue Generation von Dimerisierern und Verknüpfern zu entwickeln. Zu guter Letzt werden dringend neue Methoden benötigt, um einerseits die zelluläre Verfügbarkeit zu erhöhen und andererseits eine stabile Lokalisierung im Zellinnern zu gewährleisten.

Die meisten der beschriebenen Techniken wurden bisher in Machbarkeitsstudien beschrieben. Eine breitere Akzeptanz seitens der Zellbiologie setzt voraus, dass herausragende Anwendungen in physiologisch relevanten Zellsystemen und Modellorganismen wie *Xenopus laevis*, *C. elegans* oder Zebrafisch demonstriert werden können. Aus diesem Grund besteht das Fernziel darin, kleine Moleküle zu generieren, die nicht nur PPIs detektieren und modifizieren können, sondern die gleichzeitig PPIs in lebenden Organismen sichtbar machen.

Abschließend kann man sagen, dass es eine Reihe von Verknüpfungswerkzeugen gibt und dass wir nun vor der Herausforderung stehen, diese in interdisziplinären Experimenten zu nutzen, um wichtige biologische Fragen zu beantworten. In diesem Zusammenhang muss die Grenze dann noch weiter verschoben werden – zu Anwendungen als Therapie oder zur Diagnose in Patienten oder in Zellen von Patienten.

A.R. ist ein Stipendiat der Peter und Traudl Engelhorn-Stiftung und des EMBL Interdisciplinary Postdoc Programme. Unsere Arbeitsgruppe wird finanziell unterstützt durch das EMBL, den ESF (EuroMembrane TraPPs, Schu 943/7-1), die DFG (Transregio 83), die Helmholtz-Gemeinschaft (SBCancer und LungSysII) sowie das Deutsche Lungenforschungszentrum und die EU (Integrated project LIVIMODE).

Eingegangen am 2. März 2012
Online veröffentlicht am 11. Juni 2012

- [1] a) V. Villalobos, S. Naik, D. Piwnica-Worms, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2007**, *9*, 321–349; b) E. Phizicky, P. I. Bastiaens, H. Zhu, M. Snyder, S. Fields, *Nature* **2003**, *422*, 208–215.
- [2] C. Choudhary, M. Mann, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 427–439.
- [3] a) A. Fegan, B. White, J. C. Carlson, C. R. Wagner, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 3315–3336; b) J. D. Klemm, S. L. Schreiber, G. R. Crabtree, *Annu. Rev. Immunol.* **1998**, *16*, 569–592.
- [4] a) M. A. Farrar, J. Alberol-Ila, R. M. Perlmutter, *Nature* **1996**, *383*, 178–181; b) Z. Luo, G. Tzivivon, P. J. Belshaw, D. Vavvas, M. Marshall, J. Avruch, *Nature* **1996**, *383*, 181–185.
- [5] a) T. Inoue, W. D. Heo, J. S. Grimley, T. J. Wandless, T. Meyer, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 415–418; b) H. Haruki, J. Nishikawa, U. K. Laemmli, *Mol. Cell* **2008**, *31*, 925–932; c) M. S. Robinson, D. A. Sahlender, S. D. Foster, *Dev. Cell* **2010**, *18*, 324–331.
- [6] a) Z. L. Xu, H. Mizuguchi, T. Mayumi, T. Hayakawa, *Gene* **2003**, *309*, 145–151; b) T. Clackson, *Gene Ther.* **2000**, *7*, 120–125; c) V. M. Rivera, G. P. Gao, R. L. Grant, M. A. Schnell, P. W. Zoltick, L. W. Rozamus, T. Clackson, J. M. Wilson, *Blood* **2005**, *105*, 1424–1430.
- [7] N. Kley, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 599–608.
- [8] a) K. Baker, C. Bleczinski, H. Lin, G. Salazar-Jimenez, D. Sengupta, S. Krane, V. W. Cornish, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 16537–16542; b) P. Peralta-Yahya, B. T. Carter, H. Lin, H. Tao, V. W. Cornish, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 17446–17452; c) H. Lin, H. Tao, V. W. Cornish, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15051–15059.
- [9] a) V. M. Rivera, X. Wang, S. Wardwell, N. L. Courage, A. Volchuk, T. Keenan, D. A. Holt, M. Gilman, L. Orci, F. Cerasoli, Jr., J. E. Rothman, T. Clackson, *Science* **2000**, *287*, 826–830; b) C. T. Rollins, V. M. Rivera, D. N. Woolfson, T. Keenan, M. Hatada, S. E. Adams, L. J. Andrade, D. Yaeger, M. R. van Schravendijk, D. A. Holt, M. Gilman, T. Clackson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 7096–7101; c) A. Volchuk, M. Amherdt, M. Ravazzola, B. Brugge, V. M. Rivera, T. Clackson, A. Perrelet, T. H. Sollner, J. E. Rothman, L. Orci, *Cell* **2000**, *102*, 335–348.
- [10] P. D. Braun, K. T. Barglow, Y. M. Lin, T. Akompong, R. Briesewitz, G. T. Ray, K. Haldar, T. J. Wandless, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7575–7580.
- [11] M. A. Sellmyer, K. Stankunas, R. Briesewitz, G. R. Crabtree, T. J. Wandless, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 2703–2705.
- [12] J. E. Gestwicki, G. R. Crabtree, I. A. Graef, *Science* **2004**, *306*, 865–869.
- [13] a) J. H. Bayle, J. S. Grimley, K. Stankunas, J. E. Gestwicki, T. J. Wandless, G. R. Crabtree, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 99–107; b) S. D. Liberles, S. T. Diver, D. J. Austin, S. L. Schreiber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 7825–7830; c) K. Stankunas, J. H. Bayle, J. E. Gestwicki, Y. M. Lin, T. J. Wandless, G. R. Crabtree, *Mol. Cell* **2003**, *12*, 1615–1624; d) K. J. Liu, J. R. Aron, K. Stankunas, G. R. Crabtree, M. T. Longaker, *Nature* **2007**, *446*, 79–82.
- [14] M. R. Pratt, E. C. Schwartz, T. W. Muir, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 11209–11214.
- [15] a) J. S. Schneekloth, Jr., F. N. Fonseca, M. Koldobskiy, A. Mandal, R. Deshaies, K. Sakamoto, C. M. Crews, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3748–3754; b) J. S. Schneekloth, Jr., C. M. Crews, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 40–46.
- [16] D. M. Janse, B. Crosas, D. Finley, G. M. Church, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 21415–21420.
- [17] a) H. D. Mootz, E. S. Blum, A. B. Tyszkiewicz, T. W. Muir, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10561–10569; b) A. B. Tyszkiewicz, T. W. Muir, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 303–305.
- [18] D. M. Spencer, T. J. Wandless, S. L. Schreiber, G. R. Crabtree, *Science* **1993**, *262*, 1019–1024.
- [19] a) T. Keenan, D. R. Yaeger, N. L. Courage, C. T. Rollins, M. E. Pavone, V. M. Rivera, W. Yang, T. Guo, J. F. Amara, T. Clackson, M. Gilman, D. A. Holt, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1309–1335; b) T. Clackson, W. Yang, L. W. Rozamus, M. Hatada, J. F. Amara, C. T. Rollins, L. F. Stevenson, S. R. Magari, S. A. Wood, N. L. Courage, X. Lu, F. Cerasoli, Jr., M. Gilman, D. A. Holt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 10437–10442.
- [20] a) D. M. Spencer, I. Graef, D. J. Austin, S. L. Schreiber, G. R. Crabtree, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 9805–9809; b) V. O. Mallet, C. Mitchell, J. E. Guidotti, P. Jaffray, M. Fabre, D. Spencer, D. Arnoult, A. Kahn, H. Gilgenkrantz, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 1234–1239; c) M. E. Pownall, B. E. Welm, K. W. Freeman, D. M. Spencer, J. M. Rosen, H. V. Isaacs, *Dev. Biol.* **2003**, *256*, 89–99.
- [21] M. A. Farrar, S. H. Olson, R. M. Perlmutter, *Methods Enzymol.* **2000**, *327*, 421–429.
- [22] a) M. G. Mohi, K. Arai, S. Watanabe, *Mol. Biol. Cell* **1998**, *9*, 3299–3308; b) A. M. O'Farrell, Y. Liu, K. W. Moore, A. L. Mui, *EMBO J.* **1998**, *17*, 1006–1018.
- [23] E. L. Knight, A. J. Warner, A. Maxwell, S. A. Prigent, *Oncogene* **2000**, *19*, 5398–5405.
- [24] a) L. Sanz, M. T. Diaz-Meco, H. Nakano, J. Moscat, *EMBO J.* **2000**, *19*, 1576–1586; b) T. L. Ung, C. Cao, J. Lu, K. Ozato, T. E. Dever, *EMBO J.* **2001**, *20*, 3728–3737.
- [25] H. F. Zhao, J. Boyd, N. Jolicoeur, S. H. Shen, *Hum. Gene Ther.* **2003**, *14*, 1619–1629.
- [26] J. A. Burlison, B. S. Blagg, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4855–4858.
- [27] a) S. J. Kopytek, R. F. Standaert, J. C. Dyer, J. C. Hu, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 313–321; b) J. C. Carlson, S. S. Jena, M. Flenniken, T. F. Chou, R. A. Siegel, C. R. Wagner, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7630–7638.
- [28] a) J. Chen, X. F. Zheng, E. J. Brown, S. L. Schreiber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 4947–4951; b) J. Choi, J. Chen, S. L. Schreiber, J. Clardy, *Science* **1996**, *273*, 239–242.
- [29] a) „Controlling Protein–Protein Interactions Using Chemical Inducers and Disruptors of Dimerization“: T. Clackson in *Chemical Biology. From Small Molecules to Systems Biology and Drug Design*, Wiley-VCH, Weinheim, **2007**; b) M. Putyrska, C. Schultz, *FEBS Lett.* **2012**, DOI: 10.1016/j.febslet.2012.04.061.
- [30] a) W. D. Heo, T. Inoue, W. S. Park, M. L. Kim, B. O. Park, T. J. Wandless, T. Meyer, *Science* **2006**, *314*, 1458–1461; b) B. C. Suh, T. Inoue, T. Meyer, B. Hille, *Science* **2006**, *314*, 1454–1457; c) Z. Szentpetery, P. Varnai, T. Balla, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 8225–8230.
- [31] a) M. Putyrska, C. Schultz, *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 1126–1133; b) S. Terrillon, M. Bouvier, *EMBO J.* **2004**, *23*, 3950–3961.
- [32] J. Johnston, J. Tazelaar, V. M. Rivera, T. Clackson, G. P. Gao, J. M. Wilson, *Mol. Ther.* **2003**, *7*, 493–497.
- [33] a) J. J. Kohler, C. R. Bertozzi, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 1303–1311; b) J. J. Kohler, J. L. Czapinski, S. T. Laughlin, M. W. Schelle, C. L. de Graffenreid, C. R. Bertozzi, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1455–1458.
- [34] a) N. Umeda, T. Ueno, C. Pohlmeyer, T. Nagano, T. Inoue, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 12–14; b) A. V. Karginov, Y. Zou, D. Shirvanyants, P. Kota, N. V. Dokholyan, D. D. Young, K. M. Hahn, A. Deiters, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 420–423.
- [35] F. S. Liang, W. Q. Ho, G. R. Crabtree, *Sci. Signaling* **2011**, *4*, rs2.
- [36] a) H. N. Lin, W. M. Abida, R. T. Sauer, V. W. Cornish, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4247–4248; b) W. M. Abida, B. T. Carter, E. A. Althoff, H. Lin, V. W. Cornish, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 887–895; c) K. Baker, D. Sengupta, G. Salazar-Jimenez, V. W. Cornish, *Anal. Biochem.* **2003**, *315*, 134–137; d) S. S. Gallagher, L. W. Miller, V. W. Cornish, *Anal. Biochem.* **2007**, *363*, 160–162.
- [37] a) E. A. Althoff, V. W. Cornish, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2433–2436; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2327–2330; b) J. L. Czapinski, M. W. Schelle, L. W. Miller, S. T. Laughlin, J. J.

- Kohler, V. W. Cornish, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13186–13187.
- [38] a) S. L. Hussey, S. S. Muddana, B. R. Peterson, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3692–3693; b) S. S. Muddana, B. R. Peterson, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1409–1412.
- [39] a) S. Athavankar, B. R. Peterson, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 1245–1253; b) W. Weber, W. Bacchus, M. Daoud-El Baba, M. Fussenegger, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, e116.
- [40] S. Gendreizig, M. Kindermann, K. Johnsson, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14970–14971.
- [41] A. Levskaya, O. D. Weiner, W. A. Lim, C. A. Voigt, *Nature* **2009**, *461*, 997–1001.
- [42] M. Yazawa, A. M. Sadaghiani, B. Hsueh, R. E. Dolmetsch, *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 941–945.
- [43] M. J. Kennedy, R. M. Hughes, L. A. Peteya, J. W. Schwartz, M. D. Ehlers, C. L. Tucker, *Nat. Methods* **2010**, *7*, 973–975.
- [44] a) G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Elsevier, Amsterdam, **2008**; b) *Molecular Probes Handbook. A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, Vol. 11, Life Technologies, Carlsbad, **2010**.
- [45] K. A. Kelly, N. Bardeesy, R. Anbazhagan, S. Gurumurthy, J. Berger, H. Alenear, R. A. Depinho, U. Mahmood, R. Weissleder, *PLoS Med.* **2008**, *5*, e85.
- [46] a) N. Hino, Y. Okazaki, T. Kobayashi, A. Hayashi, K. Sakamoto, S. Yokoyama, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 201–206; b) I. S. Farrell, R. Toroney, J. L. Hazen, R. A. Mehl, J. W. Chin, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 377–384.
- [47] M. Suchanek, A. Radzikowska, C. Thiele, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 261–267.
- [48] S. A. Slavoff, D. S. Liu, J. D. Cohen, A. Y. Ting, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 19769–19776.
- [49] H. Baruah, S. Puthenveetil, Y. A. Choi, S. Shah, A. Y. Ting, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 7126–7129; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7018–7021.
- [50] a) G. Lemercier, S. Gendreizig, M. Kindermann, K. Johnsson, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 4359–4362; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4281–4284; b) A. Gautier, E. Nakata, G. Lukinavicius, K. T. Tan, K. Johnsson, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17954–17962.
- [51] A. Rutkowska, C. H. Haering, C. Schultz, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 12867–12870; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 12655–12658.
- [52] B. R. Martin, B. N. Giepmans, S. R. Adams, R. Y. Tsien, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1308–1314.
- [53] C. Hoffmann, G. Gaietta, M. Bunemann, S. R. Adams, S. Oberdorff-Maass, B. Behr, J. P. Vilardaga, R. Y. Tsien, M. H. Ellisman, M. J. Lohse, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 171–176.
- [54] a) B. Krishnan, L. M. Giersch, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 1104–1115; b) N. W. Luedtke, R. J. Dexter, D. B. Fried, A. Schebartz, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 779–784; c) R. A. Scheck, A. Schebartz, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 654–665.
- [55] B. Liu, C. T. Archer, L. Burdine, T. G. Gillette, T. Kodadek, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12348–12349.
- [56] P. Yan, T. Wang, G. J. Newton, T. V. Knyushko, Y. Xiong, D. J. Bigelow, T. C. Squier, M. U. Mayer, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1507–1518.
- [57] a) S. Mizukami, S. Watanabe, Y. Akimoto, K. Kikuchi, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 1623–1629; b) S. Watanabe, S. Mizukami, Y. Akimoto, Y. Hori, K. Kikuchi, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 8342–8349.
- [58] B. Zakeri, J. O. Fierer, E. Celik, E. C. Chittcock, U. Schwarz-Linek, V. T. Moy, M. Howarth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 690–697.
- [59] S. R. Cutler, *Sci. Signaling* **2011**, *4*, pe13.
- [60] T. L. Halo, J. Appelbaum, E. M. Hobert, D. M. Balkin, A. Schebartz, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 438–439.
- [61] H. Cao, Y. Xiong, T. Wang, B. Chen, T. C. Squier, M. U. Mayer, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8672–8673.
- [62] a) L. Davis, J. W. Chin, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 168–182; b) T. Plass, S. Milles, C. Koehler, C. Schultz, E. A. Lemke, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 3964–3967; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 3878–3881; c) T. Plass, S. Milles, C. Koehler, J. Szymański, R. Mueller, M. Wießler, C. Schultz, E. A. Lemke, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 4242–4246; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4166–4170.
- [63] P. J. Belshaw, D. M. Spencer, G. R. Crabtree, S. L. Schreiber, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 731–738.
- [64] E. J. Licita, J. O. Liu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 12817–12821.
- [65] P. J. Belshaw, S. N. Ho, G. R. Crabtree, S. L. Schreiber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 4604–4607.