BIMOLEKULARNA KOMPLEMENTACJA FLUORESCENCJI (BIFC) W BADANIACH ODDZIAŁYWAŃ BIAŁKO-BIAŁKO W ŻYWYCH KOMÓRKACH

BIMOLECULAR FLUORESCENCE COMPLEMENTATION (BIFC) TO STUDY PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS IN LIVING CELLS

Mateusz SZCZEPAŃCZYK, Ewa BŁASZCZAK

Zakład Genetyki i Fizjologii Komórki, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski

Streszczenie: Oddziaływania białko-białko leżą u podstaw wszystkich procesów biologicznych. U ludzi wiele chorób, w tym chorób neurodegeneracyjnych i nowotworowych, jest wynikiem nieprawidłowych interakcji białko-białko. Inhibicja określonych oddziaływań pomiędzy białkami stanowi więc ogromny potencjał w poszukiwaniu nowych leków. Istnieją różnorodne techniki służące do wykrywania szerokiej sieci interakcji białkowych w celu lepszego zrozumienia zarówno fizjologicznych, jak i patologicznych procesów komórkowych. Standardowe techniki biochemiczne oraz metody *in vitro* niestety nie odzwierciedlają warunków, jakie panują w żywych komórkach. Z tego względu opracowano różne metody umożliwiające bezpośrednią wizualizację oddziaływań białko-białko w żywych komórkach, a nawet całych organizmach. Jedną z takich technik jest bimolekularna komplementacja fluorescencji (BiFC). Metoda ta polega na tym, że dwa komplementarne, nieaktywne fragmenty fluorescencyjnego białka, będącego cząsteczką reporterową, mogą w bliskiej odległości utworzyć fluorescencyjny kompleks. Fragmenty te są w fuzji z badanymi białkami, które oddziałując ze sobą zbliżają fragmenty cząsteczki reporterowej do siebie. Technika BiFC została wykorzystana do wizualizacji wielu białek w różnych kompartmentach komórkowych. BiFC jest techniką stosunkowo czułą, gdy białka fuzyjne są ekspresjonowane na poziomie ich endogennych odpowiedników. Ponadto badane białka nie ulegają nadekspresji i nie znajdują się poza kontekstem fizjologicznym. Istnieje jednak szereg czynników, które należy wziąć pod uwagę planując eksperymenty z wykorzystaniem techniki BiFC. Niniejszy artykuł przedstawia stan najnowszej wiedzy dotyczącej badań interakcji białko-białko z wykorzystaniem metody BiFC i ukazuje zarówno zalety, jak i ograniczenia tej techniki.

Słowa kluczowe: oddziaływania białko-białko, technika komplementacji fragmentów białka (PCA), bimolekularna komplementacja fluorescencji (BiFC), *in vivo*

Summary: Protein-protein interactions (PPIs) underlie all biological processes. A whole range of diseases in humans, including neurodegenerative disorders and cancers, is the result of aberrant interactions among proteome components. The inhibition of these aberrant protein associations constitutes a great potential in drug discovery. The remarkable diversity of PPIs is constantly being discovered, using various techniques, to better understand both, physiological and pathological cellular processes. Standard biochemical and *in vitro* approaches do not accurately reflect the conditions that occur in living cells. Therefore, different methods that enable direct visualization of PPIs in living cells and even whole organisms have been developed; among them the Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC). This method relies on the principle that two non-fluorescent fragments of a fluorescent reporter protein can form a fluorescent complex upon getting into close proximity driven by the interacting proteins of interest, respectively fused to the non-active fragments of the reporter. The BiFC assay has been used for the visualization of many proteins in different subcellular locations. It is a sensitive PPIs detection method if the fusion proteins are expressed at levels comparable to their endogenous counterparts. More importantly, proteins of interest are not overexpressed and taken out from their native physiological context. There are, however, considerations that need to be taken while performing the BiFC analysis. Here, we discuss the recent advancements of this technique and present its advantages and limitations.

Keywords: protein-protein interactions, protein-fragment complementation assay (PCA), bimolecular fluorescence complementation (BiFC), *in vivo*

WSTĘP

Badania oddziaływań typu białko-białko w komórce są niezmiernie istotne dla zrozumienia szlaków sygnałowych na poziomie molekularnym oraz zrozumienia kluczowych procesów komórkowych. Charakterystyka białek wchodzących w interakcje z innymi białkami oraz charakterystyka sieci tych oddziaływań jest niezbędna, nie tylko do zrozumienia prawidłowego funkcjonowania komórki, ale również do opracowania leków używanych w terapii szeregu chorób, w tym nowotworowych czy neurodegeneracyjnych.

Istnieje wiele metod wykrywania oddziaływań typu białko-białko, które można podzielić na trzy grupy, w zależności od miejsca wykrywania interakcji, to jest na: metody *in vitro* (detekcja poza organizmem żywym), metody *in vivo* (detekcja w żywym organizmie) i metody *in silico* (analiza przy pomocy symulacji komputerowej, która umożliwia przewidywanie potencjalnych oddziaływań). Do metod detekcji *in vitro* należą między innymi: analiza far-western blotting, koimmunoprecypitacja białek (ang. *co-immunoprecipitation,* Co-IP), tandemowa chromatografia powinowactwa ze znacznikiem (ang. *tandem affinity purification tagging,* TAP-tag), powierzchniowy rezonans plazmonowy (ang. *surface plasmon resonance,* SPR), spektrometria mas (ang. *mass spectrometry,* MS) oraz rentgenografia strukturalna (ang. *X-ray crystallography*) [4, 25]. Metody te dostarczają wiedzy na temat wielu nieodkrytych dotąd interakcji białkowych bądź potwierdzają specyficzność określonych wcześniej interakcji. Jednak badań oddziaływań biał-

ko-białko z wykorzystaniem powyższych metod nie prowadzi się bezpośrednio w żywych komórkach czy organizmach. Wykryte w ten sposób interakcje mogą nie odzwierciedlać oddziaływań zachodzących w rzeczywistości w komórce.

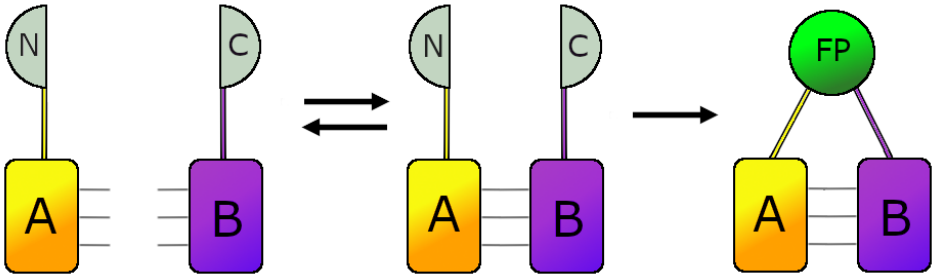
Wiele danych na temat interakcji białko-białko w żywych komórkach dostarczyły badania z wykorzystaniem drożdżowego systemu dwuhybrydowego, opisanego po raz pierwszy przez Field i Song w 1989 roku (ang. *yeast-two-hybri,* Y2H*d*) [17]. Uetz i wsp. oraz Ito i wsp. przy pomocy metody Y2H zidentyfikowali interaktom (sieć interakcji) między białkami u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* [28, 69]. W technice tej wykorzystuje się fakt, że wiele czynników transkrypcyjnych zbudowanych jest z dwóch niezależnych funkcjonalnie domen: wiążącej DNA (ang. *DNA-binding domain,* DBD) oraz aktywującej transkrypcję danego genu (ang. *activation domain,* AD). Przykładem jest tu czynnik transkrypcyjny Gal4, którego domeny (wiążącą i aktywującą) można przyłączyć do badanych białek X i Y, nazywanych odpowiednio „przynętą" (ang. *bait*) i „ofiarą" (ang. *prey*). W efekcie powstają dwa tzw. białka fuzyjne: jedno z nich związane z domeną wiążącą się z DNA, drugie zaś z domeną aktywującą transkrypcję. Oba białka fuzyjne po wprowadzeniu do komórek drożdży ulegają ekspresji. Jeśli białka te oddziałują ze sobą, domeny DBD i AD zbliżają się do siebie na tyle blisko, by móc aktywować transkrypcję genów reporterowych. Geny reporterowe ulegają ekspresji, co umożliwia wzrost drożdży na pożywce selekcyjnej [12, 53]. W systemie Y2H badane białka pochodzą jednak z nadekspresji określonych genów (ekspresja genów odbywa się zazwyczaj pod kontrolą „silnego" promotora), które są wprowadzane do komórki na plazmidach pozachromosmowych (tzw. replikacyjnych), występujących w wysokiej liczbie kopii. Badane białka są więc obecne w stężeniach znacznie wyższych niż ich rzeczywiste stężenia w komórce w warunkach fizjologicznych. To w konsekwencji prowadzi do fałszywie dodatnich wyników [3]. Zaobserwowano również, że przy pomocy standardowej metody Y2H nie można badać interakcji między białkami, które nie mogą być transportowane do jądra komórkowego. Dzieje się tak dlatego, że aby doszło do aktywacji danego genu reporterowego, interakcja musi zachodzić właśnie w jądrze komórkowym. Ponadto, nie można badać oddziaływań, do których dochodzi tylko w obecności innych stabilizujących je interakcji [65].

Opracowano więc szereg metod umożliwiających wykrywanie, a nawet wizualizację interakcji bezpośrednio w żywych komórkach. Metody te są stale optymalizowane i udoskonalane, aby umożliwić jak najmniejszą ingerencję w środowisko komórkowe. Wśród wiodących metod można wyróżnić: FRET (ang. *Förster resonance energy transfer*) [18], BRET (ang. *bioluminescence resonance energy transfer* [56, 57, 77], FCCS (ang. *fluorescence cross-correlation spectroscopy*) [1] oraz PCA (ang. *protein-fragment complementation assay*), w tym techniki wykorzystujące białka fluorescencyjne, jak bimolekularna komplementacja fluorescencji (ang. *bimolecular fluorescence complementation,* BiFC) [26] lub białka bioluminescencyjne np. lucyferazę, jak bimolekularna komplementacja luminescencji (ang. *bimolecular luminescence*

complementation, BiLC) [63]. Niniejsza praca poświęcona jest przedstawieniu stanu aktualnej wiedzy na temat techniki BiFC, która jest jedną z wiodących obecnie metod wykrywania interakcji białko-białko w żywych komórkach.

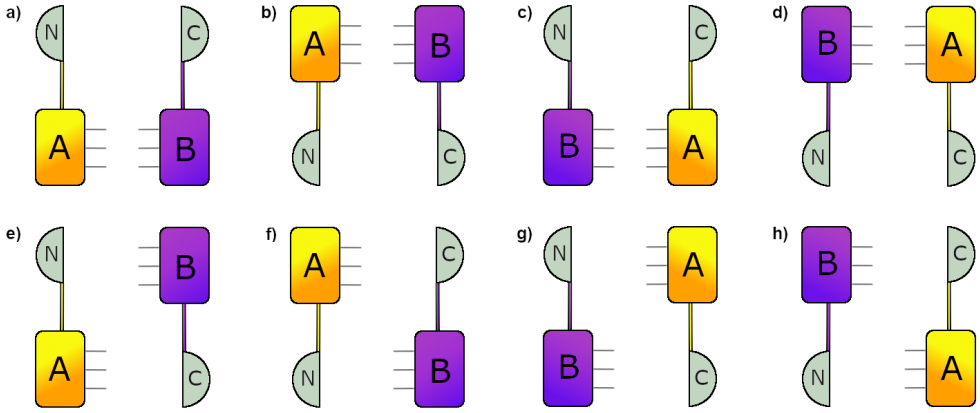
ZASADA DZIAŁANIA TECHNIKI BiFC

Bimolekularna komplementacja fluorescencji (BiFC) jest powszechnie stosowaną techniką umożliwiającą wizualizację oddziaływań między białkami w komórce. W metodzie tej wykorzystuje się dwa komplementarne fragmenty (koniec aminowy – koniec *N* i koniec karboksylowy – koniec *C*, tzw. N- i C-koniec) fluorescencyjnego białka (cząsteczki reporterowej), które oddzielnie są nieaktywne, a więc nie wykazują emisji fluorescencji. Fragmenty te łączy się następnie z białkami, których oddziaływanie jest badane (ryc.1). Białko fluorescencyjne może być dołączone do badanego białka na jego końcu *N* lub końcu *C* (ryc. 2). Jeśli badane białka wchodzą w interakcję, fragmenty białka fluorescencyjnego zbliżają się do siebie na tyle blisko, aby umożliwić odtworzenie konformacji całej cząsteczki reporterowej. Białko fluorescencyjne odzyskuje aktywność, co można obserwować i rejestrować w postaci sygnału fluorescencji. Połączenie się fragmentów białka fluorescencyjnego powoduje formowanie trwałego kompleksu [32].



RYCINA 1. Schemat przedstawiający zasadę działania techniki BiFC. Badane białka A i B połączono odpowiednio z dwoma komplementarnymi fragmentami białka fluorescencyjnego (cząsteczka reporterowa) – końcem aminowym (N) i końcem karboksylowym (C), które oddzielnie są nieaktywne, czyli nie emitują fluorescencji. W wyniku interakcji białek A i B, końce N i C zbliżają się do siebie na tyle blisko, aby fluorescencyjne białko odzyskało swoją aktywność, co może być zaobserwowane w postaci sygnału fluorescencji po wzbudzeniu fluoroforu

FIGURE 1. Schematic representation of the principle of the BiFC technique. The proteins of interest A and B were fused to two complementary fragments of the fluorescent reporter protein, the amino- (N) and carboxy-terminal fragments (C), respectively. These reporter protein fragments are inactive separately, i.e. do not emit fluorescence. When proteins A and B interact, the N- and C-terminal fragments are brought into proximity and the reporter activity is reconstituted, reproducing fluorescence emission under fluorophore excitation



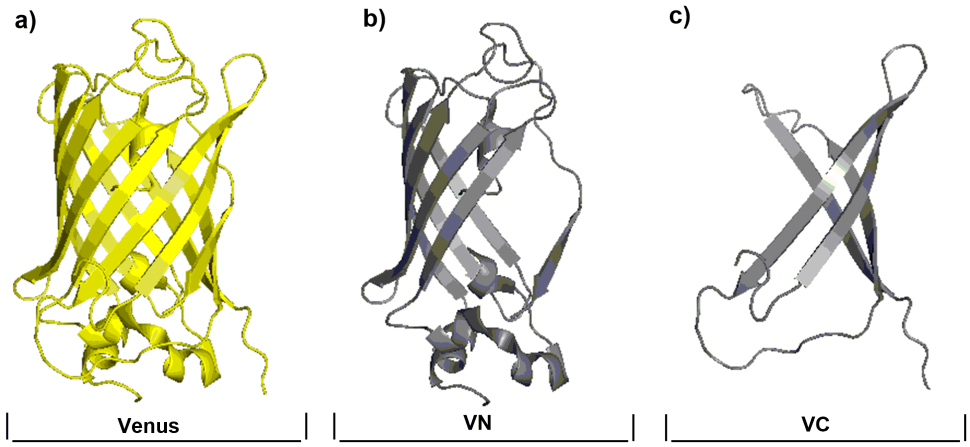
RYCINA 2. Schemat przedstawiający możliwe kombinacje badanych białek w fuzji z fragmentami (N i C) białka fluorescencyjnego. Białko fluorescencyjne może być dołączone do badanych białek na ich *N*- lub *C*-końcu, tworząc 8 możliwych kombinacji (a-h)

FIGURE 2. Schematic representation showing possible combinations of tested proteins that are fused to N- and C-terminal fragments of the fluorescent protein. The fluorescent protein can be attached to the proteins interests at their *N*- or *C*-terminus, making 8 possible combinations (a-h)

FRAGMENTY BIAŁEK FLUORESCENCYJNYCH UŻYWANE W TECHNICE BiFC

Wykorzystanie zjawiska fluorescencji w mikroskopii przyczyniło się do lepszego obrazowania poszczególnych struktur subkomórkowych, a odkrycie białka zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescent protein,* GFP) przez Shimomura i wsp. już w 1962 roku zapoczątkowało prace nad wykorzystaniem go jako znacznika biologicznego [60]. Za wyizolowanie tego niezwykłego białka z meduzy *Aequorea victoria* oraz dalsze badania nad jego właściwościami i wykorzystaniem, trzej badacze, Osamu Shimamura, Martin Chalfie i Roger Y. Tsien zostali uhonorowani Nagrodą Nobla w 2008 roku. Białko GFP doskonale sprawdza się w roli cząsteczki reporterowej i jest nietoksyczne dla komórek. Z białkiem tym można tworzyć tzw. białka fuzyjne (GFP oraz badane białko), co umożliwia uwidocznienie lokalizacji komórkowej badanego białka. Wykorzystanie białka GFP w technikach PCA, w tym w metodzie BiFC rozpoczęło się 30 lat później, po zsekwencjonowaniu genu kodującego białko GFP przez Prasher i wsp. w 1992 roku [58]. Rozpoczęto również prace nad rozwojem technik z wykorzystaniem innych znaczników fluorescencyjnych, które byłyby ulepszonymi wariantami białka GFP. Obecnie w mikroskopii fluorescencyjnej stosuje się wiele wariantów GFP, jak również inne białka fluorescencyjne. Ulepszenia i modyfikacje tych bia-

łek dotyczą głównie zwiększenia intensywności fluorescencji oraz fotostabilności danego białka fluorescencyjnego, rozszerzenia widma absorpcji, przyspieszenia dojrzewania chromoforu oraz zmniejszenia tendencji do oligomeryzacji lub agregacji, a także wrażliwości na warunki środowiska (pH i temperatura). Główne z wariantów białka GFP, które znajdują zastosowanie jako fuzyjne białka reporterowe w technice BiFC to: sfGFP (ang. *superfolder GFP*) wykazujące zmniejszone prawdopodobieństwo nieprawidłowego sfałdowania [55], EGFP (ang. *enhanced green fluorescent protein*) różniące się od GFP tylko dwoma aminokwasami w obrębie chromoforu, a wykazujące już 35 razy wyższą intensywność fluorescencji, EBFP (ang. *enhanced blue fluorescent protein*) emitujące w niebieskim zakresie spektralnym, ECFP (ang. *enhanced cyan fluorescent protein*) emitujące w niebiesko-żółtym zakresie spektralnym, YFP (ang. *yellow fluorescent protein*) emitujące w żółtym zakresie spektralnym [61]. Wszystkie wyżej wymienione białka zachowują strukturę białka GFP, ale posiadają różnice w chromoforach. W technice BiFC wykorzystano również białka o innych zakresach spektralnych i fotostabilności, m.in. białka czerwonej fluorescencji, takie jak mCherry [16] i mRFP1 (ang. *red fluorescent protein*) [29], czy białka fatoaktywacyjne o zdolności fotokonwersji (ang. *fotoswitchable*) np. Dronpa [42]. Obecnie jednymi z najczęściej wykorzystywanych w metodzie BiFC fragmentów białek fluorescencyjnych są fragmenty białka YFP, a w zasadzie jego zmodyfikowane warianty takie jak EYFP (ang. *enhanced yellow fluorescent protein*) lub Venus (ryc. 3) [50]. BiFC z wyko-



RYCINA 3. a) Trzeciorzędowa struktura białka żółtej fluorescencji Venus (PDB: 1MYW) z α-helismi i β-harmonijkami zwizualizowanymi z wykorzystaniem programu PyMOL (http://www.pymol.org/), b) Koniec aminowy białka Venus (VN), c) koniec karboksylowy białka Venus (VC)

FIGURE 3. a) Tertiary structure of Venus yellow fluorescent protein (PDB: 1MYW) with α-helices and β-sheets visualized using the PyMOL software (http://www.pymol.org/), b) N-terminal fragment Venus (VN), c) C-terminal fragment of Venus (VC)

rzystaniem EYFP było pierwszą z technik umożliwiających wizualizację interakcji białko-białko w żywych komórkach ssaczych [26]. Białko to okazało się być jednak wrażliwe na wyższe temperatury, dlatego zostało zastąpione przez białko Venus – wariant YFP z mutacją punkową F46L, wykazujące znacznie mniejszą wrażliwość na środowisko (fałdowanie nawet w 37˚C) [51]. Warto nadmienić tu jednak, że eksperymenty prowadzone przy użyciu metody BiFC, wykorzystujące białko Venus do badania interakcji białko-białko w żywych komórkach drożdży, lepiej przeprowadzać w niższych temperaturach (20-25˚C). U drożdży hodowanych w 25˚C zaobserwowano bowiem zwiększoną intensywność sygnału fluorescencji kompleksu BiFC w porównaniu do komórek drożdży pochodzących z hodowli prowadzonej w 30˚C [6]. Białko Venus zostało opisane przez Nagai i wsp. jako jasne białko fluorescencyjne z szybkim i wydajnym dojrzewaniem chromoforu [51]. Wykazano, że białko Venus ma około 10-krotnie wyższą intensywność fluorescencji niż wykorzystywane białko EYFP [61]. Dzięki tym zaletom jest ono obecnie najpowszechniej stosowane w technice BiFC.

Ze względu na to, że badane białka mogą wchodzić w interakcje nie tylko z jednym określonym białkiem, ale i z wieloma innymi białkami, technikę BiFC można poszerzyć o wykorzystanie dwóch lub więcej białek reporterowych jednocześnie (ang. *multicolor BiFC,* mcBiFC). Umożliwia to wizualizację kilku interakcji białko-białko w tej samej komórce w tym samym czasie. Warunkiem jest, że badane białka są w fuzji z białkami reporterowymi posiadającymi inne widma spektralne [35], jak np. białko zielono-niebieskiej fluorescencji Cerulean i białko żółtej fluorescencji Venus [50, 74].

ZASTOSOWANIE METODY BiFC DO BADANIA ODDZIAŁYWAŃ BIAŁKO-BIAŁKO W ŻYWYCH KOMÓRKACH

W ostatniej dekadzie technika BiFC znalazła szerokie zastosowanie do wykrywania interakcji typu białko-białko w żywych komórkach licznych organizmów. Badania z wykorzystaniem tej metody były prowadzone w odniesieniu do pojedynczych interakcji, jak również na szerszą skalę, w celu identyfikacji wielu możliwych oddziaływań. Nowo odkryte interakcje dały z kolei możliwość prowadzenia dalszych badań nad określoną funkcją, jakie dane białka mogą pełnić w komórce. Oddziaływania typu białko-białko zostały zwizualizowane przy pomocy metody BiFC m.in. w komórkach bakterii, np. *Escherichia coli* [35, 54], *Agrobacterium tumefaciens* [9], drożdży *Saccharomyces cerevisiae* [7, 14, 30, 64], nicienia *Caenorhabditis elegans* [2, 24], roślin [8, 72] oraz w komórkach ssaczych [26, 27]. Jako, że do formowania się fluoroforu niezbędny jest tlen, technika ta nie znajduje zastosowania w przypadku organizmów beztlenowych [33].

Przykładowe oddziaływania białko-białko w żywych komórkach różnych organizmów zestawiono w tabeli 1.

TABELA 1. Przykłady oddziaływań białko-białko badanych z wykorzystaniem techniki BiFC w żywych komórkach
TABLE 1. The examples of protein-protein interactions studied in living cells using BiFC technique

KOMÓRKA/ MODEL BADAWCZY	ODDZIAŁYWANIE BIAŁKO-BIAŁKO	ŹRÓDŁO
ludzka linia komórkowa HEK-293	αsynukleina – DJ-1	79
	cyklina A – p27	11
	CSPP-L – UBR5	59
	tau – tau	44
	c-Abl – Jak2	67
	Pcdh19 – N-kadheryna	5
ludzka linia komórkowa HeLa	Nef – PACS1, PACS2	15
	Mcl-1, Bcl-xL – PUMA, Bim, Noxa, Bak, Bax	70
	Gag – Staufen1, IMP1	49
ludzka linia komórkowa HCT-116	syntenina-1 – syntetaza aminoacylo-tRNA (ARS)	38
komórki ssacze COS-1	CHIP – PRMT5	78
komórki ssacze HTB-148	αsynukleina – Htt	23
komórki ssacze NSC-34	TOMM20 – VABP	20
komórki ssacze CHO-K1	VP2 – apoptyna	41
komórki roślinne *Nicotiana benthamiana*	CIPK1 – CLB1, CLB9	71
	SlTXND9 – TGBp1	48
	KTN80 – KTN1	73
komórki roślinne *Arabidopsis thaliana*	cytochrom c – BIP1, BIP2, GLY2, TCL, eIF2γ, GAPDC1, NRP1, Sm/D1, RD21	47
nicień *Caenorhabditis elegans*	IGLR-2 – PAQR-2	66
drożdże *Saccharomyces cerevisiae*	Hof1 – Chs4	52
	Asi1/Asi3 – Ubc6, Ubc7, Ubc4	37
	Ypt1 – Atg11	45
	Chm7 – Heh1, Heh2	75
	Srv2 – Dnm1	10

Jak wcześniej wspomniano jednym z organizmów szeroko wykorzystywanych do badania oddziaływań białko-białko są drożdże *S. cerevisiae*. Łatwość manipulacji genetycznych tego organizmu i możliwość znakowania badanych białek cząsteczkami reporterowymi, w tym znacznikami fluorescencyjnymi, sprawiły, że technika BiFC zaczęła być powszechnie stosowana do badania interakcji w żywych komórkach drożdży. Warto podkreślić, że w przypadku badań z użyciem metody BiFC dostępne są już gotowe kolekcje szczepów drożdży, gdzie do każdej otwartej ramki odczytu (ang. *open reading frame,* ORF) dodano sekwen-

cję kodującą fragment białka fluorescencyjnego (np. *N*-końcowy fragment białka Venus), umożliwiając analizę wielu interakcji w szybszym czasie [6, 50, 68]. Zastosowanie techniki BiFC u drożdży przyczyniło się np. do odkrycia nowego systemu kontroli jakości białek w wewnętrznej błonie jądrowej przez post-translacyjną modyfikację, jaką jest ubikwitynacja. Dowiedziono, że białka Asi1 i Ai3 (posiadające domenę RING charakterystyczną dla ligaz ubikwityny), stanowiące skład tzw. kompleksu Asi (ang. *amino acid signaling-independent*, kompleks związany z rozpoznawaniem sygnałów reakcji na aminokwasy obecne w podłożu), wchodzą m.in. w interakcję z białkami Ubc6 i Ubc7, będącymi enzymami koniugującymi ubikwitynę. Udowodniono, że białka Asi1 i Asi3 mają aktywność ligazy ubikwityny i są odpowiedzialne za proteasomalną degradację, m.in. czynnika transkrypcyjnego Stp2 oraz innych białek, nieprawidłowo zlokalizowanych w wewnętrznej błonie jądrowej [37]. Łatwość przeprowadzania samej analizy BiFC, w tym kwantyfikacji sygnału sprawiła, że metodę BiFC można obecnie zaliczyć do tzw. technik wysokoprzepustowych (ang. *high-throughput*) i mogła znaleźć ona zastosowanie do badań interakcji białko-białko na szeroką skalę nie tylko w drożdżach, ale i w komórkach ludzkich czy roślinnych [50].

Z początku analizy interakcji białko-białko z wykorzystaniem techniki BiFC u roślin wymagały nadekspresji białek fuzyjnych w ich komórkach (np. protoplastach izolowanych z komórek mezofilu), hodowlach komórkowych lub tkankach (np. tkanka miękiszowa liści *Nicotiana benthamiana*). Obecnie białka fuzyjne eksprymowane są pod natywnym promotorem, na poziomie zbliżonym do poziomu endogennego [40, 62]. Przy pomocy techniki BiFC u rośliny *Arabidopsis thaliana* wykryto ostatnio m.in. interakcje białek AtCOR47, AtERD10 i AtRAB18, należących do dehydryn (grupy białek inherentnie nieuporządkowanych, ang. *intrinsically disordered proteins*) oraz określono ich lokalizację subkomórkową. Pokazano również, że białka te tworzą homodimeryczne kompleksy i mają również zdolność do formowania heterodimerów. Subkomórkowa lokalizacja tych białek może pomóc w ustaleniu szczegółowej roli biologicznej, jaką białka te pełnią w komórce [21]. Ponadto w badaniach opublikowanych w 2019 roku przez Hernández-Sánchez i wsp. wykazano bezpośrednią interakcję dehydryny OpsDHN1 (białko o lokalizacji cytoplazmatycznej) z akwaporyną *Arabidopsis* AtPIP2B (At2G37170) (białko zlokalizowane w błonie komórkowej), wskazując na lokalizację interakcji na styku cytoplazma-błona oraz na pełnienie przez te białka funkcji ochronnej przed utratą wody przez roślinę [22].

Dzięki zastosowaniu techniki BiFC można obserwować również dynamiczne oddziaływania między białkami w obszarach komórki, które trudno zaobserwować ze względu na limit dyfrakcji światła w mikroskopii optycznej. Umożliwia ona np. badania w obszarach pomiędzy organellami komórkowymi takimi jak mitochondria i retikulum endoplazmatyczne [20]. Harmon i wsp. (2017) stworzyli model do badania interakcji białek zlokalizowanych w zewnętrznej błonie

mitochondrialnej (ang. *outer mitochondrial membranę,* OMM) i retikulum endoplazmatycznym, wykorzystując fragmenty fluorescencyjnego białka Venus. *C*-końcowy fragment białka Venus połączono z translokazą zewnętrznej błony mitochondrialnej TOMM20 (ang. *translocase of outer mitochondiral membrane 20)*, natomiast *N*-końcowym fragmentem tej cząsteczki reporterowej wyznakowano białko VAPB (ang. *vesicle-associated membrane protein-associated protein B*), zlokalizowane w błonie retikulum endoplazmatycznego. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem mysiej linii komórek nerwowych NSC-34. Taka metoda badania ułatwi określenie interakcji na styku obu organelli, których nieprawidłowa lokalizacja może odpowiadać za patogenezę chorób metabolicznych, czy schorzeń neurodegeneracyjnych [20].

Badania z użyciem techniki BiFC w żywych komórkach wykorzystano także w określeniu interakcji α-synukleiny (aSyn) z białkową deglikazą DJ-1/PARK7 (ang. Parkinson disease protein 7). Analiza wyników pozwoliła na stwierdzenie, że białko DJ-1 wchodzi w interakcję z monomerami i oligomerami aSyn, zapobiegając jej agregacji. Dzięki analizie zmutowanych form białka DJ-1, skorelowanych z dziedziczoną autosomalnie recesywnie chorobą Parkinsona, stwierdzono, że jego nieprawidłowe wersje mają ograniczoną zdolność do wiązania aSyn, przyczyniając się do formowania szkodliwych złogów, obserwowanych u pacjentów z chorobą Parkinsona, czy chorobą otępienną z ciałami Lewy'ego (ang. *dementia with Lewy bodies*). Poznanie oddziaływań między tymi białkami oraz dokładne zrozumienie mechanizmów molekularnych może pozwolić na określenie patogenezy chorób neurodegeneracyjnych. Kwestia formowania złogów jako mechanizmu obronnego komórek lub też ich powstawanie, jako przyczyna tych schorzeń, pozostaje bowiem nadal niewyjaśniona [79].

Bimolekularna komplementacja fluorescencji stała się nie tylko wiodącą techniką do badania oddziaływań białko-białko w celu zrozumienia samych mechanizmów molekularnych oraz molekularnego podłoża patogenezy wielu chorób, ale także metodą służącą do rozwoju nowych alternatywnych terapii, m.in. w przypadku chorób nowotworowych. W żywych komórkach pochodzących z linii nowotworowych wykryto np. interakcję pomiędzy czynnikiem indukowanym hipoksją 1 (HIF-1) a septyną 9 (SEPT9_i1 – izoforma 1). HIF-1 jest czynnikiem transkrypcyjnym o charakterze heterodimeru, odpowiedzialnym za regulację ekspresji ponad 100 genów, w tym genów związanych z proliferacją komórek i angiogenezą nowotworów. W warunkach normalnych czynnik ten jest konstytutywnie produkowany, a następnie degradowany przez system ubikwityna-proteasom (ang. *ubiquitin-proteasome system,* UPS). W przypadku zaburzonej dostawy tlenu do komórek i wystąpienia spadku stężenia tlenu (poniżej 2% dla większości komórek), czyli tzw. stanu hipoksji czynnik HIF-1 ulega stabilizacji, a jego zwiększona aktywność obserwowana jest w wielu typach nowotworów [31]. Septyna

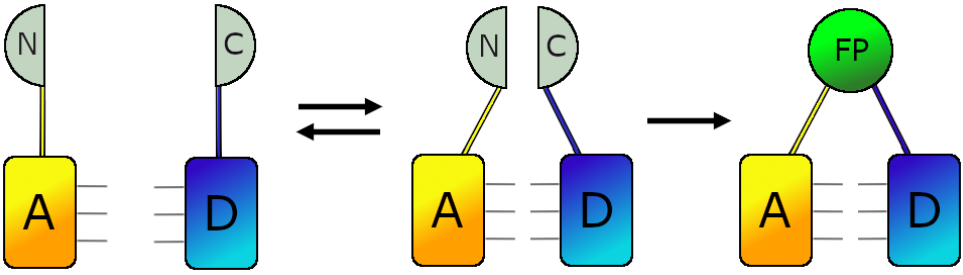
SEPT9_i1, należąca do konserwatywnej ewolucyjnie rodziny białek cytoszkieletowych wiążących GTP, jest z kolei czynnikiem stabilizującym podjednostkę czynnika indukowanego hipoksją 1 – HIF-1α oraz ułatwiającym jego transport między cytoplazmą a jądrem komórkowym [19]. Golan i Mabjeesh (2017) wykazali specyficzną interakcję tych białek w oparciu o metodę BiFC, gdzie wykorzystano dwa fragmenty białka żółtej fluorescencji YFP, koniec *N* – YN i koniec *C* – YC). Testowano również małocząsteczkowe związki, które mogłyby wpływać na interakcję tych dwóch białek obserwując zwiększenie lub zmniejszenie intensywności sygnału BiFC. Wiedza ta może być przydatna do tworzenia nowych terapii nowotworowych [19], polegających np. na blokowaniu określonych oddziaływań z wykorzystaniem różnych związków małocząsteczkowych.

Chibazakura i Asano (2017) wykorzystali technikę BiFC do badań na nowotworowych liniach komórkowych, chcąc odpowiedzieć na pytanie, dlaczego w niektórych liniach nowotworowych nie dochodzi do zatrzymania cyklu komórkowego pomimo normalnego poziomu ekspresji białka p27 w tych liniach. Białko p27 jest głównym inhibitorem kinaz zależnych od cyklin (ang. *cyclin-dependent kinase,* CDK) u ssaków i odgrywa znaczącą rolę w kontroli proliferacji komórek, a jego inaktywacja może prowadzić do karcenogenezy. Wchodzi ono w interakcję z kompleksem Cdk2-cyklina A odpowiedzialnym za regulację cyklu komórkowego. Dzięki poznanej strukturze trzeciorzędowej kompleksu CycA-Cdk2-p27 stworzono konstrukcję genetyczną *CycA-YFPN* i *YFPC-p27* (do białek dołączono komplementarne fragmenty białka YFP). Po transfekcji komórek pochodzących z linii komórkowej HEK293 (linia wywodząca się z ludzkich embrionalnych komórek nerki, ang. *human embryonic cell line*) udało się wykryć specyficzną interakcję między białkami CycA i p27, a następnie wykazano, że białka te formują funkcjonalny kompleks. Następnie, również z wykorzystaniem techniki BiFC, zbadano tę samą interakcję w nowotworowych liniach komórkowych: U-2 OS (ang. *human osteosarcoma*), MDAH041 (ang. *human Li-Fraumeni syndrome fibroblasts*), KATO III (ang. *human gastric carcinoma*), HeLa (ang. *human uterine cervix carcinoma*), A431 (ang. *human epidermoid carcinoma*), Caco-2 (ang. *human colorectal adenocarcinoma*), HepG2 (ang. *human hepatocellular carcinoma*), Saos-2 (ang. *human osteosarcoma*), HT1080 (ang. *human fibrosarcoma*), MCF7 (ang. *human breast adenocarcinoma cells*) oraz w liniach kontrolnych WI-38 (ang. *human normal diploid fibroblasts*) i HEK293. Sygnał BiFC wykryto jedynie w sześciu przypadkach (w liniach U-2 OS, MDAH041, KATO III, HeLa oraz WI-38 i HEK293). W pozostałych liniach nie wykryto sygnału BiFC, wskazując na słabsze oddziaływanie tych białek, co potwierdzono metodą koimmunoprecypitacji. Wyniki te mogą świadczyć również o zmienionej post-translacyjnej regulacji białek p27 i CycA lub wpływie innych czynników regulatorowych w przypadku wybranych nowotworowych linii komórkowych [11].

ZALETY I WADY METODY BiFC

Bimolekularna komplementacja fluorescencji jest techniką umożliwiającą badanie oddziaływań białko-białko bezpośrednio w żywych komórkach lub nawet całych organizmach, co stanowi jej podstawową zaletę, gdyż zmniejsza to ryzyko powstawania artefaktów, wynikających z nadekspresji badanych białek i umieszczeniu ich poza organizmem. Zalety i wady tej techniki zostały opisane w wielu pracach [14, 35, 37, 77]. Warto jednak podkreślić dwie zalety. Po pierwsze, z wykorzystaniem techniki BiFC można wykryć bardzo słabe i przejściowe interakcje między białkami (stała dysocjacji $K_D \sim 1$ mM) [46], a oddziałujące ze sobą białka tworzą stały, nieodwracalny kompleks. Ponadto technika BiFC dostarcza informacji o lokalizacji subkomórkowej badanych interakcji. Zalety te mogą okazać się jednak w pewien sposób wadami; metoda ta jest nieodwracalna, co uniemożliwia analizę oddziaływań białek w czasie rzeczywistym.

Dodatkowo, subkomórkowa lokalizacja badanych interakcji powinna być ostrożnie interpretowana i zweryfikowana ze względu na to, że wchodzące w interakcje białka będąc w kompleksie BiFC mogą nie zawsze znajdować się w komórce w miejscu, w którym dochodzi do rzeczywistego oddziaływania pomiędzy



RYCINA 4. Schemat przedstawiający wynik fałszywie dodatni w technice BiFC. Badane białka A i D połączono odpowiednio z dwoma komplementarnymi fragmentami białka fluorescencyjnego (cząsteczka reporterowa) – końcem aminowym (N) i końcem karboksylowym (C), które oddzielnie są nieaktywne, czyli nie emitują fluorescencji. Przy odpowiedniej konformacji i bliskim kontakcie końców N i C, w momencie braku interakcji białek A i D, mogą zbliżyć się one na tyle blisko, aby fluorescencyjne białko odzyskało swoją aktywność, co może być zaobserwowane w postaci sygnału fluorescencji po wzbudzeniu fluoroforu. Białka A i D nie weszły jednak w interakcję, a wynik taki jest fałszywie dodatni
FIGURE 4. Schematic representation showing the possibility of false-positive result using the BiFC technique. The proteins of interest A and D were fused to two complementary fragments of the fluorescent reporter protein, the amino- (N) and carboxy-terminal fragments (C), respectively. These reporter protein fragments are inactive separately, i.e. do not emit fluorescence. With a proper conformation and a close contact of the N- and C-terminal fragments, when proteins A and D are not interacting, the fluorescent protein may regain its activity. This can be observed as a fluorescence signal emitted after the excitation of the fluorophore. Since proteins A and D did not interact, this result is a false positive

tymi białkami. Kolejną wadą jest to, że dwa fragmenty białka fluorescencyjnego, znajdujące się w bliskiej odległości od siebie, mogą złączyć się ze sobą nawet przy braku interakcji badanych białek (ryc. 4). Fluorescencyjne białko odzyska swoją aktywność, emitując fałszywie dodatni sygnał fluorescencji [43, 50].

ZALECENIA

EKSPERYMENTY Z UŻYCIEM ODPOWIEDNICH KONTROLI

Jak wspomniano, w przypadku wad techniki BiFC, fragmenty fluorescencyjnych białek fuzyjnych mogą mieć silne powinowactwo i zbliżając się stosunkowo blisko ulec sfałdowaniu (przy braku interakcji), co z kolei prowadzi do utworzenia funkcjonalnej cząsteczki reporterowej i emisję fluorescencji (wynik fałszywie dodatni) [43, 50]. Z tego względu do eksperymentów z wykorzystaniem techniki BiFC zaleca się włączenie odpowiednich kontroli. Najlepszą kontrolę stanowi wykorzystanie dodatkowego białka, o którym wiadomo, że nie wchodzi w interakcję z badanym białkiem, lub lepiej, użycie zmutowanej wersji badanego białka w miejscu jego oddziaływania [39] (jeśli dostępne są dane strukturalne i znane są domeny wchodzące w interakcje). Kontrolą może być również użycie jednego z fragmentów fluorescencyjnych niepołączonego z jednym z badanych białek. Nie jest to jednak najlepsza kontrola, m.in. dlatego, że takie konstrukcje genetyczne mogą różnić się poziomem ekspresji lub mieć inną lokalizację subkomórkową niż kiedy występują w fuzji z badanym białkiem [6].

ANALIZA ILOŚCIOWA SYGNAŁU FLUORESCENCJI

Należy również wspomnieć o kwantyfikacji sygnału BiFC, która jest niezmiernie istotna w poprawnej interpretacji wyników. Niektóre komórki charakteryzują się znaczną autofluorescencją, jak np. komórki drożdży. Istotne jest więc, aby w mikroskopie, w którym prowadzimy obserwacje, ustawić odpowiedni kanał rejestracji sygnału autofluorescencji komórek (możliwe jest to w przypadku pracy z mikroskopem konfokalnym) tak, aby można było oddzielić sygnał autofluorescencji od właściwego sygnału BiFC. Szczegółowy opis analizy ilościowej sygnału BiFC został opisany przez Błaszczak i wsp. (2016). Podczas planowania eksperymentów warto również uwzględnić znacznik wskazujący na określoną lokalizację subkomórkową, np. marker jądrowy w fuzji z białkiem czerwonej fluorescencji, jeśli badane białka znajdują się w fuzji z fragmentami białka żółtej fluorescencji [6].

POTWIERDZENIE WYNIKÓW ALTERNATYWNYMI METODAMI

Ostatni aspekt stanowi potwierdzenie wyników otrzymanych w eksperymentach z wykorzystaniem techniki BiFC dodatkową metodą. Jest to konieczne szczególnie w przypadku, gdy nie posiadamy odpowiedniej kontroli (czyli np. zmutowanej wersji białka, która blokowałaby interakcję). W tym celu można wykorzystać szereg metod m.in. koimmunoprecypitację, techniki PCA oparte o luminescencję, jak BiLC lub termoforeza mikroskalowa (ang. *microscale thermophoresis,* MST) [37].

PODSUMOWANIE

Oddziaływania białko-białko zaangażowane są w szereg procesów komórkowych: podział komórek, metabolizm, transdukcja sygnału i odpowiedź immunologiczna. Odszyfrowanie sieci interakcji komórkowych pomaga nie tylko zrozumieć niektóre podstawowe procesy biologiczne i mechanizmy molekularne, ale może prowadzić do identyfikacji nowych celów terapeutycznych oraz rozwoju alternatywnych terapii w kierunku wielu chorób. Interaktom człowieka jest nadal w dużej mierze niezbadany, ponieważ trudno jest skonstruować odpowiedni system do wysokowydajnych badań przesiewowych. Dlatego tak ważne stają się badania interakcji białko-białko w żywych komórkach organizmów modelowych oraz ludzkich liniach komórkowych, a technika BiFC jest jedną z metod umożliwiających szybką wizualizację oddziaływań między białkami.

Jest ona stosunkowo czułą i łatwą techniką opartą o mikroskopię (możliwość wykorzystania prostego mikroskopu fluorescencyjnego lub mikroskopu konfokalnego). Wizualizacja lokalizacji interakcji białko-białko w komórce odbywa się przez detekcję sygnału fluorescencji. Kilka białek fluorescencyjnych zostało pomyślnie zoptymalizowanych i zastosowanych w doświadczeniach z wykorzystaniem BiFC, w tym: GFP, YFP, Venus i mCherry. Ideą techniki jest podział danego białka fluorescencyjnego na dwie części, będące w fuzji z badanymi białkami. Komplementarne fragmenty białka fluorescencyjnego nie są w stanie emitować sygnału fluorescencji, natomiast w wyniku zbliżenia się do siebie dzięki interakcji badanych białek łączą się w funkcjonalne białko fluorescencyjne, emitując sygnał. Wyniki mogą być jednak fałszywie dodatnie, gdyż nawet przy braku interakcji, fragmenty fluorescencyjnych białek, będąc w bliskiej odległości, mogą utworzyć funkcjonalną cząsteczkę reporterową. Dlatego, przy planowaniu eksperymentów należy zawrzeć odpowiednie kontrole lub potwierdzić interesujący nas wynik alternatywną metodą. Bardzo ważne jest jednak to, że komplementacja białek fluorescencyjnych prowadzi do wytworzenia nieodwracalnego kompleksu,

co umożliwia wychwytywanie słabych i przejściowych interakcji. W ostatnich latach zmaksymalizowano potencjał techniki BiFC do badania wielu interakcji białko-białko w wysokowydajny sposób (analizy na szeroką skalę), a analizy oddziaływań białkowych z jej wykorzystaniem dostarczyły już wielu informacji na temat mechanizmów molekularnych w różnych organizmach modelowych i komórkach ssaczych.

PODZIĘKOWANIA

Artykuł sfinansowano z grantu NCN nr 2016/21/D/NZ1/00285. Ewa Błaszczak otrzymała stypendium START Fundacji na rzecz Nauki Polskiej i Stypendium Rządu Francuskiego (BGF).

LITERATURA

[1] Bacia K, Kim SA, Schwille P. Fluorescence cross-correlation spectroscopy in living cells. *Nat Methods.* 2006; **3(2)**: 83-89.
[2] Bae E-J, Kim D-K, Kim C i wsp. LRRK2 kinase regulates α-synuclein propagation via RAB35 phosphorylation. *Nat Commun*. 2018; **9(1)**: 3465.
[3] Bartel P, Chien CT, Sternglanz R, Fields S. Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques.* 1993; **14(6)**: 920-924.
[4] Beggard T, Linse S, James P. Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Proteomics*. 2007; **7(16)**: 2833-2842.
[5] Biwas S, Emond MR, Jontes JD. Protocadherin-19 and N-cadherin interact to control cell movements during anterior neurulation. *J Cell Biol*. 2010; **191(5)**: 1029-1041.
[6] Blaszczak E, Prigent C, Rabut G. Bimolecular fluorescence complementation to assay the interactions of ubiquitylation enzymes in living yeast cells. *Methods Mol Biol.* 2016; **1449:** 223-241.
[7] Blondel M, Bach S, Bamps S i wsp. Degradation of Hof1 by SCF(Grr1) is important for actomyosin contraction during cytokinesis in yeast. *EMBO J*. 2005; **24(7)**: 1440-1452.
[8] Bracha-Dori K, Shichrur K, Katz A i wsp. Detection of protein-protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J*. 2004; **40(3)**: 419-427.
[9] Cascales E, Atmakuri K, Liu Z, Binns AN, Christie PJ. Agrobacterium tumefaciens oncogenic suppressors inhibit T-DNA and VirE2 protein substrate binding to the VirD4 coupling protein. *Mol Microbiol*. 2005; **58(2)**: 565-579.
[10] Chen Y-C, Cheng T-H, Lin W-L i wsp. Srv2 Is a Pro-fission Factor that Modulates Yeast Mitochondrial Morphology and Respiration by Regulating Actin Assembly. *iScience*. 2019; **11**: 305-317.
[11] Chibazakura T, Asano Y. Defective interaction between p27 and cyclin A-CDK complex in certain human cancer cell lines revealed by split YFP assay in living cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2017; **81(12)**: 2360-2366.
[12] Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R, Fields S. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; **88(21)**: 9578-9582.
[13] Ciruela F. Fluorescence-based methods in the study of protein–protein interactions in living cells. *Curr Opin Biotechnol*. 2008; **19(4)**: 338-343.

[14] Cole Kc, Mclaughlin HW, Johnson DI. Use of bimolecular fluorescence complementation to study in vivo interactions between Cdc42p and Rdi1p of Saccharomyces cerevisiae. *Eukaryot Cell*. 2007; **6(3)**: 378-387.
[15] Dikeakos JD, Thomas L, Kwon G, Elferich J, Shinde U, Thomas G. An interdomain binding site on HIV-1 Nef interacts with PACS-1 and PACS-2 on endosomes to down-regulate MHC-I. *Mol Biol Cell*. 2012; **23(11)**: 2184-2197.
[16] Fan J-Y, Cui Z-Q, Wei H-P i wsp. Split mCherry as a new red bimolecular fluorescence complementation system for visualizing protein-protein interactions in living cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; **367(1)**: 47-53.
[17] Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*. 1989; **340(6230)**: 245-246.
[18] Forster T. Transfer mechanisms of electronic excitation. *Discuss Faraday Soc*. 1959; **27**: 7-17.
[19] Golan M, Mabjeesh NJ. Imaging of hypoxia-inducible factor 1α and septin 9 interaction by bimolecular fluorescence complementation in live cancer cells. *Oncotarget*. 2017; **8(19)**: 31830-31841.
[20] Harmon M, Larkman P, Hardingham G, Jackson M, Skehel P. A Bi-fluorescence complementation system to detect associations between the endoplasmic reticulum and mitochondria. *Sci Rep.* 2017; **7(1)**: 17467.
[21] Hernandez-Sanchez IE, Maruri-Lopez I, Graether SP, Jimenez-Bremont JF. In vivo evidence for homo- and heterodimeric interactions of Arabidopsis thaliana dehydrins AtCOR47, AtERD10, and AtRAB18. *Sci Rep*. 2017; **7(1)**:17036.
[22] Hernandez-Sanchez IE, Maruri-Lopez I, Molphe-Balch EP, Beccera-Flora A, Jaimes-Miranda F, Jimenez-Bremont JF. Evidence for in vivo interactions between dehydrins and the aquaporin AtPIP2B. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019; **510(4)**: 545-550.
[23] Herrera F, Outeiro TF. α-Synuclein modifies huntingtin aggregation in living cells. *FEBS Lett*. 2012; **586(1)**: 7-12.
[24] Hiatt Sm, Shyu YJ, Duren HM, Hu CD. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis of protein interactions in *Caenorhabditis elegans*. *Methods*. 2008; **45(3)**: 185-191.
[25] Howell JM, Winstone TL, Coorssen JR, Turner RJ. An evaluation of in vitro protein-protein interaction techniques: assessing contaminating background proteins. *Proteomics*. 2006; **6(7)**: 2050-2069.
[26] Hu CD, Chinenov Y, Kerppola TK. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell.* 2002; **9(4)**: 789-798.
[27] Hynes TR, Tang L, Mervine SM i wsp. Visualization of G protein betagamma dimers using bimolecular fluorescence complementation demonstrates roles for both beta and gamma in subcellular targeting. *J Biol Chem*. 2004; **279(29)**: 30279-30286.
[28] Ito T, Chiba T, Ozawa R, Yoshinda M, Hattori M, Sakaki Y. A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; **98(8)**: 4569-4574.
[29] Jach G, Pesch M, Richter K, Frings S, Uhrig JF. An improved mRFP1 adds red to bimolecular fluorescence complementation. *Nat Methods*. 2006; **3(8)**: 597-600.
[30] Johnson N, West M, Odorizzi G. Regulation of yeast ESCRT-III membrane scission activity by the Doa4 ubiquitin hydrolase. *Mol Biol Cell*. 2017; **28(5)**: 661-672.
[31] Jun JC, Rathore A, Younas H, Gilkes D, Polotsky VY. Hypoxia-Inducible Factors and Cancer. *Curr sleep Med reports*. 2017; **3(1)**: 1-10.
[32] Kerppola TK. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annu Rev Biophys*. 2008; **37**: 465-487.
[33] Kerppola TK. Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells. *Nat Protoc.* 2006; **1(3)**: 1278-1286.
[34] Kerppola TK. Design of Fusion Proteins for Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC). *Cold Spring Harb Protoc*. 2013; **2013(8)**.
[35] Kerppola TK. Multicolor Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) Analysis of Protein Interactions with Alternative Partners. *Cold Spring Harb Protoc.* 2013; **2013(9)**

[36] Kerppola TK. Visualization of molecular interactions by fluorescence complementation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006; **7(6)**: 449-456.
[37] Khmelinskii A, Blaszczak E, Pantazopoulou M i wsp. Protein quality control at the inner nuclear membrane. *Nature*. 2014; **516(7531)**.
[38] Kim Sb, Kim HR, Park MC, i wsp. Caspase-8 controls the secretion of inflammatory lysyl-tRNA synthetase in exosomes from cancer cells. *J Cell Biol*. 2017; **216(7)**: 2201-2216.
[39] Kodama Y, Hu CD. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): a 5-year update and future perspectives. *Biotechniques*. 2012; **53(5)**: 285-298.
[40] Kudla J, Bock R. Lighting the Way to Protein-Protein Interactions: Recommendations on Best Practices for Bimolecular Fluorescence Complementation Analyses. *Plant Cell*. 2016; **28(5)**: 1002-1008.
[41] Lai GH, Lien YY Lin MK i wsp. VP2 of Chicken Anaemia Virus Interacts with Apoptin for Down-regulation of Apoptosis through De-phosphorylated Threonine 108 on Apoptin. *Sci Rep*. 2017; **7(1)**: 14799.
[42] Lee YR, Park JH, Hahm SH i wsp. Development of bimolecular fluorescence complementation using Dronpa for visualization of protein-protein interactions in cells. *Mol Imaging Biol.* 2010; **12(5)**: 468-478.
[43] Levy ED, Kowarzyk H, Michnick SW. High-resolution mapping of protein concentration reveals principles of proteome architecture and adaptation. *Cell Rep*. 2014; **7(4)**: 1333-1340.
[44] Lim S, Kim D, Ju S i wsp. Glioblastoma-secreted soluble CD44 activates tau pathology in the brain. *Exp Mol Med*. 2018; **50(4)**: 5.
[45] Lipatova Z, Belogortseva N, Zhang XQ, Kim J, Taussig D, Segev N. Regulation of selective autophagy onset by a Ypt/Rab GTPase module. *Proc Natl Acad Sci*. 2012; **109(18)**: 6981-6986.
[46] Magliery TJ, Wilson CGM, Pan W i wsp. Detecting protein-protein interactions with a green fluorescent protein fragment reassembly trap: scope and mechanism. *J Am Chem Soc*. 2005; **127(1)**: 146-157.
[47] Martinez-Fabregas J, Diaz-Moreno I, Gonzalez-Arzola K i wsp. New Arabidopsis thaliana Cytochrome c Partners: A Look Into the Elusive Role of Cytochrome c in Programmed Cell Death in Plants. *Mol Cell Proteomics*. 2013; **12(12)**: 3666-3676.
[48] Mathioudakis M, Khechmar S, Owen C i wsp. A Thioredoxin Domain-Containing Protein Interacts with Pepino mosaic virus Triple Gene Block Protein 1. *Int J Mol Sci.* 2018; **19(12)**: 3747.
[49] Milev MP, Brown CM, Mouland AJ. Live cell visualization of the interactions between HIV-1 Gag and the cellular RNA-binding protein Staufen1. *Retrovirology*. 2010; **7(1)**: 41.
[50] Miller KE, Kim Y, Huh WK, Park HO. Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) Analysis: Advances and Recent Applications for Genome-Wide Interaction Studies. *J Mol Biol*. 2015; **427(11)**: 2039-2055.
[51] Nagai T, Ibata K, Park ES, Kubota M, Mikosjiba K, Miiyawaki A. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol*. 2002; **20(1)**: 87-90.
[52] Oh Y, Schreiter JH, Okada H i wsp. Hof1 and Chs4 Interact via F-BAR Domain and Sel1-like Repeats to Control Extracellular Matrix Deposition during Cytokinesis. *Curr Biol*. 2017; **27(18)**: 2878-2886.
[53] Parrish JR, Gulyas KD, Finley RL. Yeast two-hybrid contributions to interactome mapping. *Curr Opin Biotechnol*. 2006; **17(4)**: 387-393.
[54] Pazos M, Natale P, Margolin W, Vicente M. Interactions among the early Escherichia coli divisome proteins revealed by bimolecular fluorescence complementation. *Environ Microbiol*. 2013; **15(12):** 3282-3291.
[55] Pedelacq JD, Cabantous S, Tran T, Terwilliger TC, Waldo GS. Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*. 2006; **24(1)**: 79-88.
[56] Pfleger KDG, Seeber RM, Eidne KA. Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for the real-time detection of protein-protein interactions. *Nat Protoc*. 2006; **1(1)**: 337-345.

[57] Pfleger KDG. Analysis of Protein–Protein Interactions Using Bioluminescence Resonance Energy Transfer. *Methods Mol Biol*. 2009; **574(1)**: 173-183.
[58] Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene*. 1992; **111(2)**: 229-233.
[59] Shearer RF, Frikstad KAM, Mckenna J i wsp. The E3 ubiquitin ligase UBR5 regulates centriolar satellite stability and primary cilia. *Mol Biol Cell*. 2018; **29(13)**: 1542-1554.
[60] Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, purification and properties of Aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan Aequorea. *J Cell Comp Physiol*. 1962; **59(3)**: 223-239.
[61] Shyu YJ, Liu H, Deng X, Hu CD. Identification of new fluorescent protein fragments for bimolecular fluorescence complementation analysis under physiological conditions. *Biotechniques*. 2006; **40(1)**: 61-66.
[62] Smaczniak C, Immink RGH, Muino JM i wsp. Characterization of MADS-domain transcription factor complexes in Arabidopsis flower development. *Proc Natl Acad Sci*. 2012; **109(5)**: 1560-1565.
[63] Stefan E, Aquin S, Berger N i wsp. Quantification of dynamic protein complexes using Renilla luciferase fragment complementation applied to protein kinase A activities in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; **104(43)**: 16916-16921.
[64] Sung MK, Huh WK. Bimolecular fluorescence complementation analysis system for in vivo detection of protein-protein interaction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2007; **24(9)**: 767-775.
[65] Sung MK, Lim G, Yi DG i wsp. Genome-wide bimolecular fluorescence complementation analysis of SUMO interactome in yeast. *Genome Res*. 2013; **23(4)**: 736-746.
[66] Svensk E, Devkota R, Stahlman M i wsp. *Caenorhabditis elegans* PAQR-2 and IGLR-2 protect against glucose toxicity by modulating membrane lipid composition. *PLOS Genet*. 2016; **12(4)**: e1006112.
[67] Tao W, Leng X, Chakraborty SN, Ma H, Arlinghaus RB. c-Abl Activates Janus Kinase 2 in Normal Hematopoietic Cells. *J Biol Chem*. 2014; **289(31)**: 21463-21472.
[68] Tong AHY, Boone C. 16 High-throughput strain construction and systematic synthetic lethal screening in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Microbiol*. 2007; **36**: 369-707.
[69] Uetz P, Giot L, Cagney G i wsp. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in Saccharomyces cerevisiae. *Nature*. 2000; **403(6770)**: 623-627.
[70] Vela L, Gonzalo O, Naval J, Marzo I. Direct interaction of Bax and Bak proteins with Bcl-2 homology domain 3 (BH3)-only proteins in living cells revealed by fluorescence complementation. *J Biol Chem*. 2013; **288(7)**: 4935-4946.
[71] Waadt R, Schmidt LK, Lohse M, Hashimoto K, Bock R, Kudla J. Multicolor bimolecular fluorescence complementation reveals simultaneous formation of alternative CBL/CIPK complexes in planta. *Plant J.* 2008; **56(3)**: 505-516.
[72] Walter M, Chaban C, Schutze K i wsp. Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J*. 2004; **40(3)**: 428-438.
[73] Wang C, Liu W, Wang G i wsp. KTN80 confers precision to microtubule severing by specific targeting of katanin complexes in plant cells. *EMBO J*. 2017; **36(23)**: 3435-3447.
[74] Wang S, Ding M, Chen X, Chang L, Sun Y. Development of bimolecular fluorescence complementation using rsEGFP2 for detection and super-resolution imaging of protein-protein interactions in live cells. *Biomed Opt Express*. 2017; **8(6)**: 3119-3131.
[75] Webster BM, Thaller DJ, Jager J, Ochmann SE, Borah S, Lusk CP. Chm7 and Heh1 collaborate to link nuclear pore complex quality control with nuclear envelope sealing. *EMBO J*. 2016; **35(22)**: 2447-2467.
[76] Wouters E, Vasudevan L, Crans RAJ, Saini DK, Stove CP. Luminescence- and fluorescence-based complementation assays to screen for GPCR oligomerization: current state of the art. *Int J Mol Sci*. 2019; **20(12)**: 2958.

[77] Xu Y, Piston DW, Johnson CH. A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; **96(1)**: 151-156.
[78] Zhang HT, Zeng LF, He QT, Tao WA, Zha ZG, Hu CD. The E3 ubiquitin ligase CHIP mediates ubiquitination and proteasomal degradation of PRMT5. *Biochim Biophys Acta – Mol Cell Res.* 2016; *1863(2)*: 335-346.
[79] Zondler L, Miller-Fleming L, Repici M i wsp. Dj-1 interactions with α-synuclein attenuate aggregation and cellular toxicity in models of Parkinson's disease. *Cell Death Dis*. 2014; **5(7)**: e1350.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 16.10.2019
Przyjęto: 15.11.2019
Ewa Błaszczak
Zakład Genetyki i Fizjologii Komórki, Instytut Biologii Eksperymentalnej
Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski,
ul. Kanonia 6/8, 50-328 Wrocław
e-mail: ewa.blaszczak@uwr.edu.pl
tel. +48 71 375 41 02,
fax. +48 71 375 41 18