

УДК 577.21

## БЕЛКОВАЯ КОМПЛЕМЕНТАЦИЯ КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕЖБЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ЖИВОЙ КЛЕТКЕ

© 2012 г. С. П. Чумаков<sup>1, 2\*</sup>, Ю. Е. Кравченко<sup>1, 2</sup>, П. М. Чумаков<sup>1, 3, 4</sup><sup>1</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117997 Россия<sup>3</sup>Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, 630090<sup>4</sup>Lerner Research Institute, Cleveland Clinic Foundation, Cleveland OH 44195 USA

Поступила в редакцию 18.01.2012 г.

Принята к печати 10.02.2012 г.

Образование и распад белок-белковых комплексов играют важную роль в различных процессах, протекающих в живой клетке. Нарушение белок-белковых взаимодействий наблюдается при различных патологиях. Изучение природы этих взаимодействий будет способствовать более глубокому пониманию молекулярных основ патогенеза болезней и поможет в разработке новых подходов к их терапии. В настоящее время существует множество методов, позволяющих выявлять и анализировать взаимодействия белков *in vitro*. Однако более точные данные можно получить, изучая межбелковые взаимодействия *in vivo*, в живой системе. Один из немногих перспективных методов такого рода основан на эффекте комплементации фрагментов репортерных белков. Репортерные системы такого рода основаны на изменении флуоресцентных свойств или ферментативной активности белков, которые можно измерять при помощи колориметрических, люминесцентных или иных субстратов. Принцип комплементации широко используется для анализа межбелковых взаимодействий, определения порядка взаимодействия белков-партнеров в отдельных сигнальных путях, а также в высокопроизводительных скрининговых исследованиях с целью обнаружения и картирования ранее неизвестных межбелковых взаимодействий. Возможности уже созданных комплементационных репортерных систем позволяют решать задачи, далеко выходящие за рамки простой регистрации взаимодействий двух и более белков.

**Ключевые слова:** репортерная система, белок-белковые взаимодействия, белковая комплементация, сплит-люцифераза, бимолекулярная флуоресцентная комплементация.

PROTEIN COMPLEMENTATION AS TOOL FOR STUDYING PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS IN LIVING CELLS, by S. P. Chumakov<sup>1, 2\*</sup>, J. E. Kravchenko<sup>1, 2</sup>, P. M. Chumakov<sup>2, 3, 4</sup> (<sup>1</sup>Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia; \*e-mail: stepan@chumakov.com; <sup>2</sup>Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia; <sup>3</sup>Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia; <sup>4</sup>Lerner Research Institute, Cleveland Clinic Foundation, Cleveland OH 44195 USA). Association and degradation of protein complexes play essential role in a majority of normal and pathologic processes, which take place in living cell. Studying the underlying mechanisms of those interactions would give deeper understanding of specific causes of disease progression and would allow developing new therapeutic strategies. The majority of technical approaches currently used for detecting protein association include *in vitro* protein extraction and purification, whereas more relevant results require methods that can be used *in vivo*. One of a few approaches for *in vivo* protein association detection is based on reporter protein fragment complementation. Reporter systems based on protein complementation rely on reconstitution of reporter protein fluorescent or enzymatic activity which occurs upon reassociation of protein fragments and could be measured by colorimetry, luminometry or fluorimetry. Protein complementation is widely used to develop reporter systems for analysis of protein interactions, for functional dissection of signal transduction pathways and for performing high-throughput screenings to discover new protein interaction partners. Currently developed approaches that utilize protein fragment complementation have possibilities that extend far beyond simple detection of interaction in a pair of proteins.

**Keywords:** reporter system, protein complementation assay, SLCA, BiFC.

Принятые сокращения: BiFC – бимолекулярная комплементация флуоресценции; UBP – убиквитиновая протеаза; ТФ – фактор транскрипции; СПД – сигнал протеасомной деградации; уCD – цитозиндезаминаза дрожжей; оуCD – оптимизированная уCD; SLCA – репортерные конструкции на основе сплит-люцифераз; FRET – резонансный перенос энергии флуоресценции; CALM – комплемент-активируемая световая микроскопия; DHFR – дигидрофолатредуктаза.

\*Эл. почта: stepan@chumakov.com

## ВВЕДЕНИЕ

После расшифровки структуры генома человека, когда активно секвенируются полные геномы различных организмов, рост числа белков с известной первичной структурой значительно опережает накопление сведений о функциях, выполняемых этими белками. В постгеномную эру на первый план выходят функции белков, а также домены, участвующие в белок-белковых взаимодействиях.

Образование белок-белковых комплексов, их ассоциация и диссоциация играют важную роль во множестве процессов, протекающих в живой клетке. Репликация ДНК, транскрипция, сплайсинг и синтез белков осуществляются молекулярными машинами, построенными из большого числа компонентов, посредством белок-белковых взаимодействий. Взаимодействия между белками участвуют в передаче сигналов внутрь клетки (взаимодействие белковых лигандов с рецепторами), во внутриклеточной передаче сигналов по цепи последовательных взаимодействий между сигнальными молекулами. Сигнальные пути контролируют обмен веществ, поддержание гомеостаза, процессы развития и старения. Нарушения белковых взаимодействий в сигнальных цепях играют важную роль в патогенезе различных заболеваний, в том числе онкологических. Совокупность взаимодействий между белками формирует интерактом, расшифровка которого позволит раскрыть механизмы функционирования и регуляции клеточных процессов.

Белки могут соединяться друг с другом, образуя либо временные комплексы, либо стабильные структуры. В результате возможна модификация одного или обоих компонентов комплекса с изменением их функции. С другой стороны, сами модификации белков, такие как, например, фосфорилирование, дефосфорилирование, ацетилирование, окисление SH-групп, могут способствовать или формированию комплексов, или их диссоциации, изменяя функцию взаимодействующих белков.

В основе множества патологий лежит, в частности, образование или накопление в клетке “неправильных” белковых агрегатов, которые могут служить мишенями при проведении лекарственной терапии.

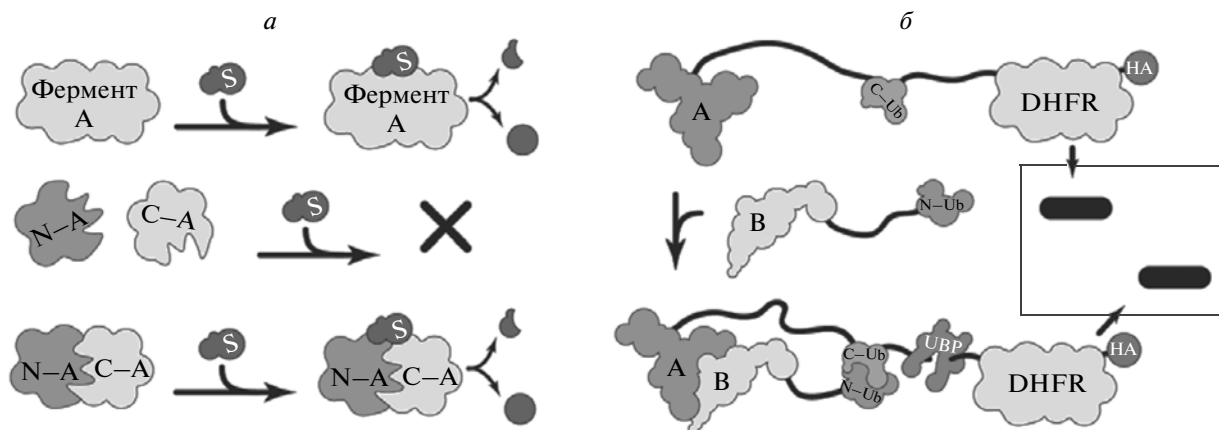
Существует множество методов выявления и анализа белковых взаимодействий *in vitro*. Как правило, они основаны на получении и очистке белковых экстрактов, что может влиять на состояние белков и их взаимодействие, поэтому более точные данные можно получить в живой системе *in vivo*. Желательно, чтобы такие методы позволяли количественно оценивать взаимодействия. В одном из подходов такого рода используется эффект комплементации фрагментов репортерных белков. Разрабатываемые по этому принципу ре-

портерные системы основаны на изменении флуоресценции или ферментативной активности белка, что можно измерять с помощью колориметрических, люминесцентных или иных субстратов. Способы детекции, применяемые в таких системах, могут иметь свои преимущества и недостатки.

Принцип работы репортерных систем может включать обнаружение функциональной комплементации между фрагментами репортерного белка, т.е. способности двух неактивных частей репортерного белка спонтанно взаимодействовать при сближении и восстанавливать активность (рис. 1а). Детектируемая активность появляется в том случае, когда два сближившихся фрагмента формируют активную вторичную структуру. Поэтому, если оба фрагмента находятся в клетке в свободном состоянии, то вероятность их реассоциации невысока, и, как следствие, невелика и выявляемая активность. Если же репортерные фрагменты присоединены к белкам, которые обладают взаимным сродством, вероятность встречи и воссоединения репортерных фрагментов увеличивается, что приводит к появлению активности. В зависимости от степени сродства будет меняться и активность репортерного белка.

В число наиболее часто используемых репортерных белков входят убиквитин [1], варианты зеленого (GFP) [2] или красного (dsRED) [3] флуоресцентных белков [4, 5], дигидрофолатредуктаза (DHFR) [6],  $\beta$ -лактамаза [7],  $\beta$ -галактозидаза [8, 9], TEV-протеаза [10], люцифераза [11] и другие. В зависимости от репортерного белка активность можно выявлять по интенсивности флуоресценции, люминесценции и цветного окрашивания, по изменению количества клеток, выживших после обработки цитотоксичным агентом, и по другим легко детектируемым проявлениям. При этом активность ряда репортерных белков можно измерять разными способами. Например, активность DHFR можно определить как по превращению люминесцентного субстрата, так и по приобретению клетками устойчивости к метотрексату. Активность  $\beta$ -галактозидазы можно обнаружить при помощи как люминесцентных, так и окрашенных субстратов. Существует также метод бимолекулярной комплементации флуоресценции (BiFC), в котором измеряют флуоресценцию клеток, возникающую при соединении фрагментов флуоресцентных белков.

Принцип белковой комплементации широко используется в комплементационных репортерных системах для анализа межбелковых взаимодействий. Такие системы позволяют изучать как порядок взаимодействия белков-партнеров в отдельных сигнальных путях, так и проводить высокопроизводительные скрининги с целью обнаружения и картирования неизвестных ранее межбелковых взаимодействий. Некоторые репортерные системы, основанные на принципе комплементации, пригодны для отслеживания



**Рис. 1.** *а* – Принцип действия белковой комплементации. Фермент, способный расщеплять субстрат (S), искусственно делят на две неактивные части. Если две неактивные части вступают во взаимодействие, то активность фермента восстанавливается. *б* – Репортерная система, использующая комплементацию сплит-убиквитина для регистрации взаимодействия двух белков. Белок А соединен с С-концевым фрагментом убиквитина, к которому присоединена меченая HA-эпитопом дигидрофолатредуктаза (DHFR). Белок В соединен с N-концевым фрагментом убиквитина. Если белки А и В связываются, то половинки убиквитина также воссоединяются, что приводит к их распознаванию убиквитинового протеазой (UBP) и отщеплению от HA-DHFR. Этот процесс регистрируется с помощью Вестерн-блоттинга и антител к HA.

изменений белковых комплексов под действием лекарственных средств, влияющих на проведение внутриклеточных сигналов, что позволяет изучать детали механизмов влияния биологически активных веществ на клеточный метаболизм.

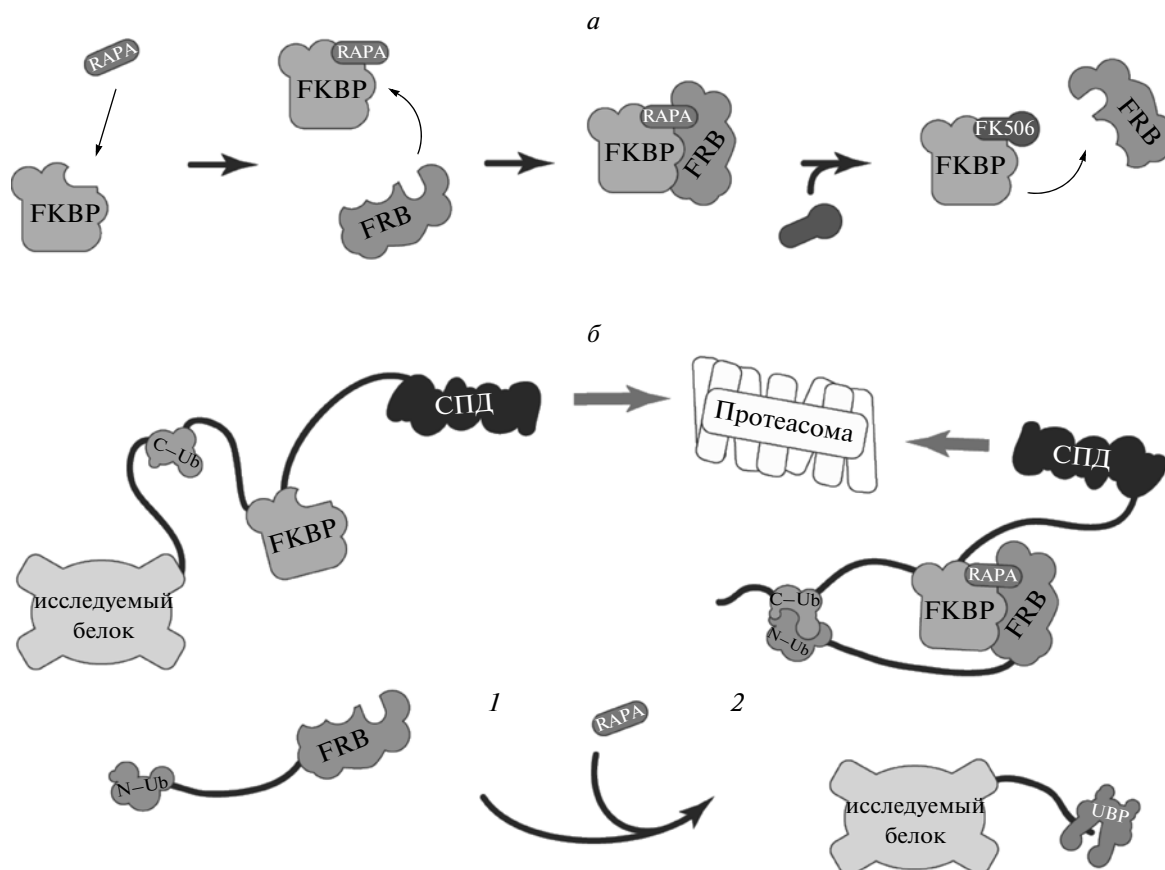
### РАЗНООБРАЗИЕ КОМПЛЕМЕНТАЦИОННЫХ РЕПОРТЕРНЫХ СИСТЕМ

Одним из первых репортерных белков для определения межбелковых взаимодействий стал убиквитин, небольшой и вездесущий белок, вовлеченный в регуляцию времени жизни и активности белков во множестве биологических процессов. Убиквитин может ковалентно пришиваться к остаткам лизина в белках и осуществлять их убиквитинирование при помощи убиквитин-конъюгирующих ферментов. Остатки убиквитина с меченых белковых молекул удаляются убиквитин-специфичными протеазами (UBP). В репортерной конструкции на основе убиквитина используется способность UBP узнавать и отщеплять только правильно сложенный убиквитин. Пришитые к изучаемым белкам половинки молекулы убиквитина, в которые для уменьшения их взаимного сродства введены дополнительные мутации, могут воссоединяться только при значительном сближении или благодаря сродству между пришитыми к ним белками. В этом случае убиквитин принимает конформацию, в которой он может опознаваться и отщепляться UBP. В результате удаления остатка убиквитина изменяется подвижность репортерного белка, что можно определить методом Ве-

стерн-блоттинга. Исходно в качестве репортерного белка использовали DHFR с прикрепленным HA-эпитопом (рис. 1б) [1].

Описанный подход, впервые примененный на дрожжевой модели, был логическим развитием и усовершенствованием дрожжевой двухгибридной системы. В классической двухгибридной системе один белок соединяется с фрагментом фактора транскрипции (ТФ), закрепленным на сайте связывания ТФ, а другой – с другим фрагментом этого ТФ. Взаимодействие двух белков приводит к соединению половинок ТФ на сайте связывания и последующей экспрессии репортерного гена. В отличие от двухгибридной системы сплит-убиквитиновая репортерная система позволяет наблюдать за белок-белковыми взаимодействиями, происходящими не только в ядре, но и в составе клеточных структур, например на плазматической мембране. При помощи этого подхода проведен успешный поиск белков, связывающихся *in vivo* с дрожжевым белком Sec3p, ассоциированным с эндоплазматическим ретикулом [12]. Единственное условие при использовании этого подхода состоит в присутствии в том же клеточном компартменте активной UBP [13].

Для тестирования функционирования систем на основе белковой комплементации наиболее часто используется рапамицин-зависимое связывание белка FKBP с FKBP-рапамицин-связывающим доменом (FRB) протеинкиназы TOR (или FRAP) (рис. 2а) [14]. Макролидный антибиотик рапамицин обладает целым спектром разнообразных активностей, в частности, он способен подавлять секрецию интерлейкина-2. Рапамицин индуцирует связывание FKBP и киназы TOR, что



**Рис. 2.** *a* – Рапамицин-зависимое взаимодействие FK506-связывающего белка (FKBP) с FKBP-рапамицин-связывающим доменом белка FRAP (FRB). Добавление антагониста рапамицина – FK506, приводит к диссоциации комплекса. *б* – Принцип действия системы рапамицин-зависимой активации белка: исследуемый белок последовательно соединяется с фрагментом убиквитина (C-Ub), FKBP и сигналом деградации в протеасомах (СПД). Комплементарный фрагмент убиквитина (N-Ub) сливается с FRB. В отсутствие рапамицина СПД вызывает деградацию связанных с ним белков в протеасомах. Добавление рапамицина приводит к связыванию FKBP с FRB и к последующему воссоединению половинок убиквитина, распознаванию убиквитина убиквитиновыми протеазами и последующему отщеплению изучаемого белка. В результате этот белок не подвергается разрушению в протеасомах.

приводит к ее ингибированию. Именно ингибирование TOR лежит в основе физиологических эффектов, характерных для рапамицина. Поскольку взаимодействие двух белков индуцируется малой молекулой (рапамицином), этот процесс можно тонко контролировать, модулируя концентрацию рапамицина, что позволяет оценивать изменение активности репортера, сопровождающее связывание FKBP и FRB. Возможность произвольного контроля гетеродимера FKBP и FRB может использоваться и для управляемой активации белков при помощи сплит-убиквитина. С этой целью белок, функцию которого предполагается контролировать, “сливают” с фрагментом убиквитина, соединенного, в свою очередь, с FRB и сигналом разрушения в протеасомах (СПД) (рис. 2б). Комплементарный фрагмент убиквитина сливается с FKBP. FRB и связанные с ним белки в отсутствие взаимодействия с FKBP быстро подвергаются разрушению в протеасомах. Добавление рапамицина приводит к

образованию комплекса между FKBP и FRB, что вызывает комплементацию фрагментов убиквитина, который распознается UBP и отщепляется от контролируемого белка вместе с FRB и СПД. В результате время полужизни контролируемого белка существенно возрастает, что увеличивает и его функциональную активность [15].

### РЕПОРТЕРНЫЕ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ СПЛИТ-ФЕРМЕНТОВ

Большинство молекулярно-биологических репортерных систем основано на выстраивании взаимосвязи между изучаемым событием и активацией фермента или флуоресцентного белка. Популярными ферментами, используемыми в качестве репортерных, например,  $\beta$ -галактозидаза,  $\beta$ -лактамаза или люцифераза, в клетках млекопитающих отсутствуют, что обеспечивает низкий уровень фонового сигнала. Эти ферменты обладают высокой специфичностью к субстрату и высокой

чувствительностью, что позволяет точно измерять их активность. В отличие от флуоресцентных белков, сигнал ферментативного репортера можно усилить путем более продолжительной инкубации с субстратом, что дополнительно расширяет рабочий диапазон его чувствительности.

$\beta$ -Галактозидаза – фермент, расщепляющий клетчатку, кодируется геном *lacZ Escherichia coli*. Этот фермент стал одной из первых моделей для белковой инженерии. Оказалось, что  $\beta$ -галактозидазу можно разрезать на два неравных фрагмента, ферментативная активность которых способна восстановиться при сближении (эффект  $\alpha$ -комплементации). Эффект  $\alpha$ -комплементации  $\beta$ -галактозидазы широко используется для создания комплементационных репортерных систем. К достоинствам  $\beta$ -галактозидазы относится малый размер одного из ее фрагментов –  $\alpha$ -пептида, N-концевого участка, состоящего всего из 56 аминокислотных остатков. Такой пептид, если его присоединить к исследуемому белку, практически не влияет на способность перемещаться между клеточными структурами. Наряду со стандартными способами введения репортерных конструкций в клетку (трансфекция экспрессирующими конструкциями или трансдукция рекомбинантным вирусом), возможно и прямое применение компонентов комплементационного репортерного белка. Так, например, фрагменты  $\beta$ -галактозидазы, присоединенные биотин-стрептавидиновыми мостиками к эпидермальному фактору роста или к трансферрину, позволяют с высокой чувствительностью определять взаимную локализацию соответствующих этим лигандам рецепторов на поверхности раковой клетки, что важно для наблюдения за развитием опухоли и эффективностью терапии [16].

Интересный вариант комплементационной системы – система на основе сплит-тимидинкиназы, позволяющая наблюдать межбелковые взаимодействия в трансгенных мышцах *in vivo*. Активирующаяся при комплементации фрагментов тимидинкиназы вируса простого герпеса типа 1 (HSV1) способна фосфорилировать радиоактивно меченные производные урацила, что приводит к их накоплению внутри клетки. Это накопление можно наблюдать путем сканирования мышей методом позитронной эмиссионной томографии (PET) [17].

Другое необычное применение белковой комплементации – репортерная система на основе термофильных бактерий *Thermus thermophilus*. В этой системе используется комплементация фрагментов бактериальной аденилаткиназы (AK<sub>Тн</sub>), способной функционировать при температуре 78°C, она может применяться в скрининговых исследованиях *in vivo* с целью поиска термостабильных белковых комплексов [18].

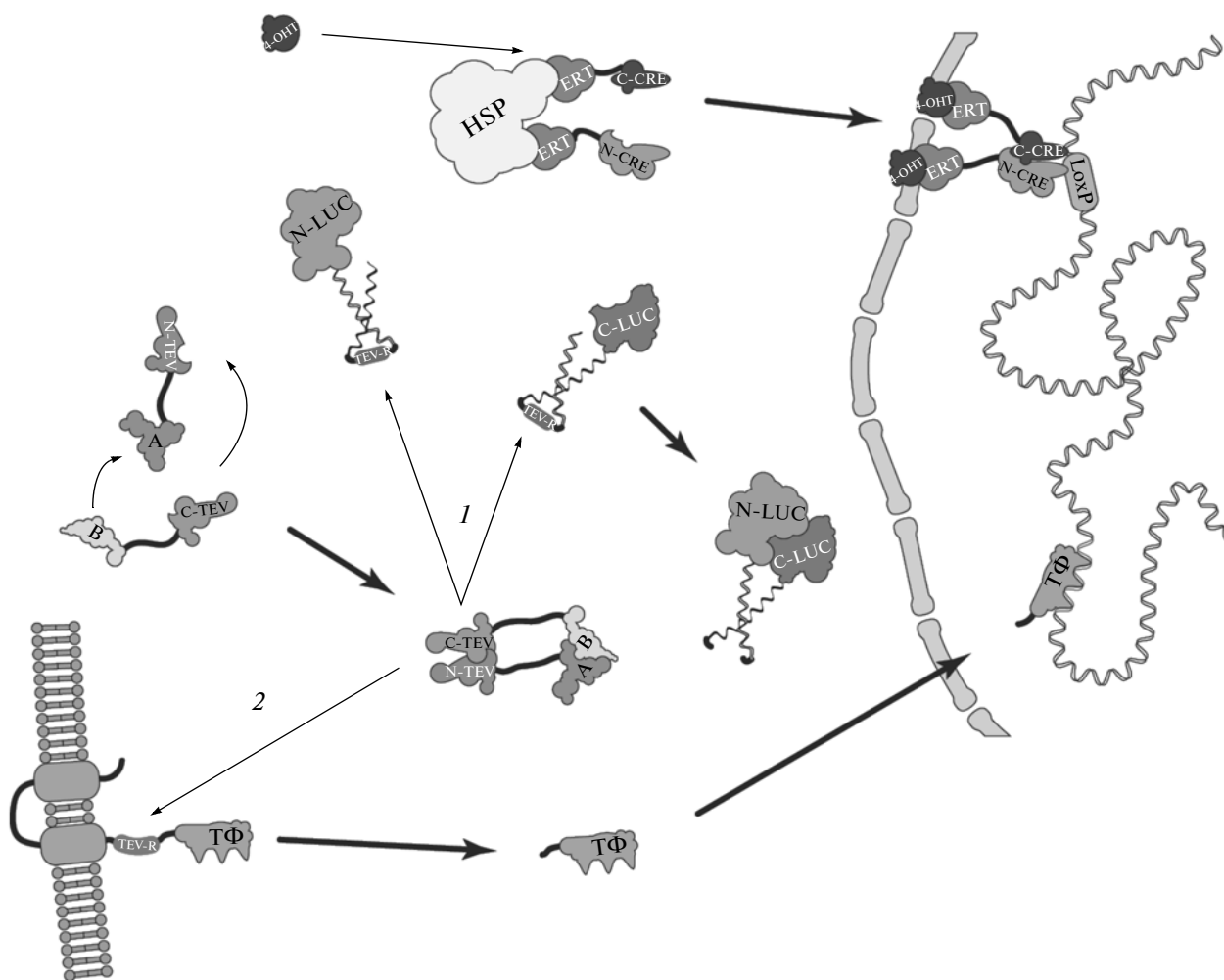
Белковую комплементацию можно использовать не только для регистрации белок-белковых взаимодействий, но и для локальной избирательной активации введенной в организм конструкции. Экспрессия в мышцах под контролем двух тканеспецифичных промоторов фрагментов кДНК сплит-рекомбиназы Cre, слитой с мутированным тамоксифен-чувствительным рецептором эстрадиола (ERT2), позволяет добиться контролируемой и исключительно точной тканеспецифичной активации фермента, вырезающего из генома LoxP-фланкированные участки ДНК (рис. 3а) [19].

Сходный с убиквитиновой репортерной системой принцип действия имеет и система на основе сплит-TEV-протеазы (tobacco etch virus protease). TEV-протеаза эффективно работает при 37°C, не содержит сайтов узнавания в белках млекопитающих, а ее усиленная экспрессия хорошо переносится клетками. Восстановление активности TEV-протеазы можно зарегистрировать в результате транскрипционной активации – индуцированного протеолизом высвобождения заякоренного на плазматической мембране или в цитоплазме ТФ, который, перемещаясь в ядро, активирует экспрессию репортерного белка (люциферазы или флуоресцентного белка) (рис. 3б). Зарегистрировать активность протеазы можно и путем прямой протеолитической активации. Для этого в клетках экспрессируют неактивные репортерные белки (модифицированную люциферазу или вариант GFP), активность которых восстанавливается под действием TEV-протеазы [10].

### СКРИНИНГ БЕЛКОВ ПРИ ПОМОЩИ КОМПЛЕМЕНТАЦИОННЫХ РЕПОРТЕРНЫХ СИСТЕМ

Репортерные системы на основе комплементации используются не только для изучения взаимодействий между двумя белками, они удобны и для выявления белков-партнеров. С этой целью применяют системы, в которых активация сплит-фермента сопровождается приобретением устойчивости к ядам. В качестве примера можно привести комплементационную репортерную систему на основе сплит-DHFR, используемой для скрининга в клетках пекарских дрожжей (рис. 4а). DHFR, необходимая для *de novo* синтеза нуклеотидов в клетках дрожжей, ингибируется метотрексатом, в то время как в репортерной системе используются фрагменты нечувствительного к метотрексату мутантного фермента. Эти фрагменты соединяются с исследуемыми белками и, если белки взаимодействуют, то образуется “работоспособная” DHFR, что делает клетку устойчивой к метотрексату [20].

Комплементационная система на основе оптимизированной цитозиндезаминазы (ouCD) дрожжей может применяться в двухступенчатом скри-



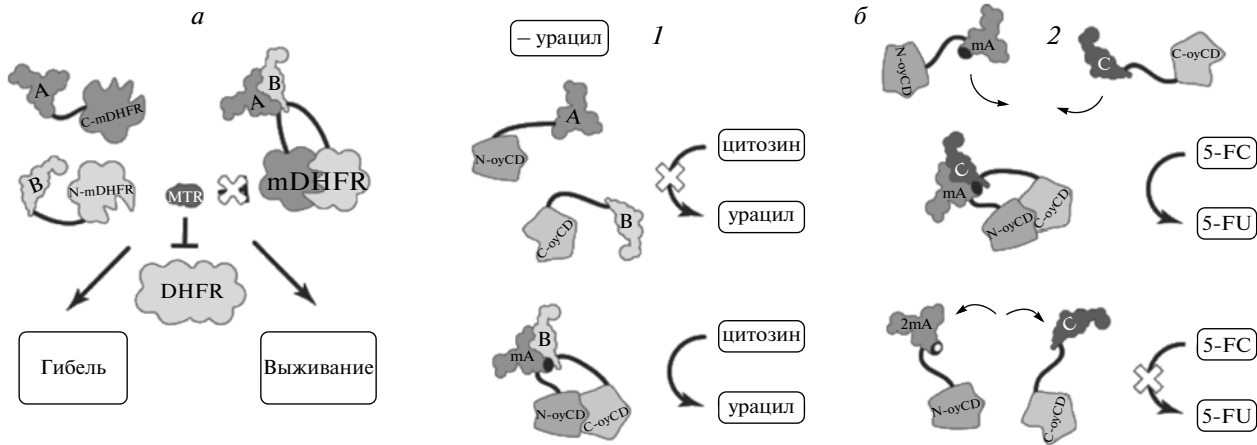
**Рис. 3.** *a* – Механизм активации сплит-рекомбиназы Cre. В отсутствие лиганда (4-гидрокситамоксифена, 4OHT) мутантные рецепторы эстрогенов (ERT) закоривают фрагменты CRE в цитоплазме на белках теплового шока (HSP). Добавление 4OHT освобождает ERT из комплекса с HSP и позволяет фрагментам CRE комплементировать и перемещаться в ядро. *б* – Варианты регистрации активации сплит-протеазного репортера на примере сплит-протеазы TEV: воссоединение белков А и В приводит к комплементации фрагментов TEV. 1 – Протеаза расщепляет участки, соединяющие две комплементарные  $\alpha$ -спирали, присоединенные либо к N-фрагменту люциферазы (соединена со спиралью 1), либо к С-фрагменту (соединена со спиралью 2). Эти спирали выделены разными оттенками серого. После расщепления соединяющего участка, спирали 1 и 2, входящие в разные комплексы, могут рекомбинировать, что приведет к образованию активной люциферазы. 2 – Протеаза расщепляет белковую цепь, соединяющую фактор транскрипции (ТФ) с белком, закоренным на мембране. Освободившийся фактор транскрипции способен переместиться в ядро и активировать транскрипцию репортерного гена.

нинге для выявления взаимодействия мутантных вариантов исследуемого белка с двумя различными партнерами. уCD катализирует превращение цитозина в урацил, что позволяет клеточной культуре выживать в питательной среде без урацила. уCD способен дезаминировать не только цитозин, но и 5-фторцитозин (5-FT), превращая его в 5-фторурацил (5-FU), метаболит которого, 5-фторурацилтрифосфат (5-FUTP), чрезвычайно токсичен. Таким образом, появление оуCD в клетках дрожжей, лишенных эндогенного фермента в результате делеции гена *FCY1*, приведет к тому, что они смогут выживать без урацила, однако будут гибнуть при добавлении 5-FT. Использо-

вание сплит-оуCD может предусматривать проведение двух последовательных раундов селекции. Сначала на среде без урацила отбирают варианты мутантного белка 1, которые взаимодействуют с белком 2, а затем скринингом в присутствии 5-FT из отобранных вариантов выбирают те, которые не взаимодействуют с белком 3 (рис. 4б) [21].

### СПЛИТ-ЛЮЦИФЕРАЗНЫЕ РЕПОРТЕРНЫЕ СИСТЕМЫ

Пожалуй, наиболее часто для создания комплементационных репортерных систем использу-



**Рис. 4.** *a* – Механизм действия сплит-дигидрофолатредуктазной репортерной системы. Фрагменты мутантной DHFR (mDHFR), нечувствительной к метотрексату, соединяются с изучаемыми белками. Если белки не взаимодействуют, то обработка клеток метотрексатом приводит к подавлению эндогенной DHFR и гибели. Если белки взаимодействуют, то фрагменты mDHFR рекомбинируют, и в клетках появляется активная DHFR, нечувствительная к метотрексату. *б* – Двухступенчатая система для поиска вариантов белков, обладающих сродством к определенным мишеням. *1* – Поиск мутантного варианта белка А, способного связываться с белком В. Варианты белка А соединяются с N-концевым фрагментом цитозиндезаминазы (N-оуCD), катализирующей превращение цитозина в урацил, а белок В – с C-концевым этого фермента (С-оуCD). Оба белка вводят в клетки дрожжей, не содержащие эндогенную оуCD, и культивируют в среде без урацила. В отсутствие урацила клетки могут выжить только в присутствии активной оуCD, которая образуется, если вариант белка А (mA) свяжется с белком В. *2* – Определенный на стадии *1* mA, связывающийся с белком В, взаимодействует также с белком С, что нежелательно. Библиотека вариантов mA соединяется с N-оуCD, а белок С – с С-оуCD. Обе конструкции вводятся в клетки дрожжей той же линии, что и в *1*. Клетки культивируют в среде с добавлением 5-фторцитозина (5-FC). оуCD способен превращать нетоксичный 5-FC в токсичный 5-FU, что приводит к гибели клеток. Таким образом можно отобрать только те клетки, в которых нет активной оуCD, и, как следствие, есть mA, не связывающийся с белком С.

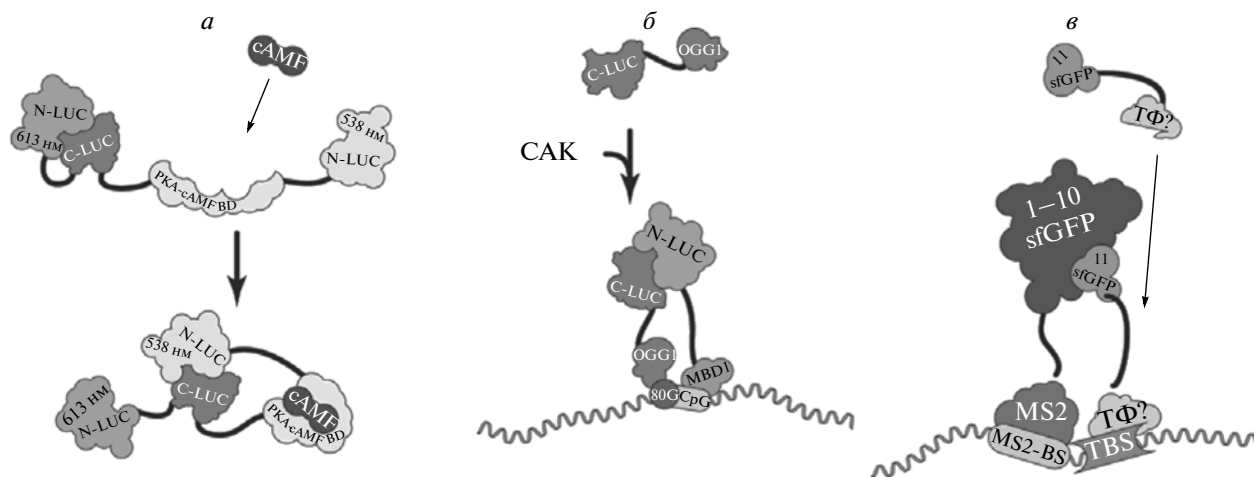
ются люциферазы, группа ферментов, которые каталитически окисляют субстрат (например люциферин), что приводит к кратковременному выбросу фотонов света. Широкое использование люцифераз в качестве репортерных белков обусловлено простотой определения их активности и большим динамическим диапазоном регистрируемых значений.

В репортерных конструкциях на основе сплит-люцифераз (SLCA, split-luciferase complementation assay) используются пять различных ферментов: люциферазы светлячков (*Photinus pyralis*) [22], жуков-щелкунов (*Pyrophorus plagiophthalmus* и *P. termittilluminans*) [23, 24], *Renilla reniformis* [11] и веслоногого рачка (*Gaussia princeps*) [25]. Первые два фермента в качестве субстрата используют люциферин светлячков, имеют достаточно крупные размеры (61 кДа) и зависят от кофакторов (АТФ и ионы магния). Люциферазы *R. reniformis* и *G. princeps* окисляют целентеразин, более компактны (36 и 20 кДа соответственно) и не нуждаются в кофакторах.

Хотя использование сплит-люцифераз для изучения межбелковых взаимодействий *in vivo* более трудоемко по сравнению со сплит-флуоресцентными белками, эти репортерные системы обладают рядом уникальных преимуществ. SLCA-системы пригодны для работы даже при очень небольших уровнях экспрессии, что связа-

но с практически полным отсутствием фонового сигнала, поскольку в эукариотических клетках нет люминесценции. Появление даже незначительных количеств активного фермента можно измерить достоверно и количественно. С другой стороны, низкая интенсивность флуоресценции делает SLCA-системы малопригодными для микроскопии. Другое важное достоинство SLCA-систем – обратимость процесса комплементации фрагментов люциферазы – качество, которого нет у систем на основе комплементации флуоресценции. Необратимое соединение репортерных доменов может помочь в поиске и визуализации “редких” белковых взаимодействий, однако, необратимо комплементирующий репортерный белок не позволяет измерять кинетику ассоциации и диссоциации белковых комплексов. SLCA-системы лишены этого недостатка, они позволяют точно регистрировать динамику взаимодействия двух белков. Так, например, в опытах с белками FKBP и FRB, мечеными сплит-люциферазой, люминесценцию регистрировали после обработки клеток рапамицином, в то время как после добавления в среду FK506 (или такролимуса), конкурентного антагониста рапамицина, люминесценция быстро исчезала [25].

Существенный недостаток SLCA-систем – зависимость регистрируемых показаний от субстрата, постепенное истощение которого приводит к



**Рис. 5.** *а* – Биосенсор на концентрацию сАМР. В отсутствие сАМР конформация сАМР-связывающего домена протеинкиназы А (РКА-сАМР BD) способствует связыванию С-концевого фрагмента люциферазы с N-концевым (длина волны люминесценции 613 нм). При захвате сАМР конформация РКА-сАМР BD изменяется, сближая связанные с ним С-концевой фрагмент люциферазы и N-концевой фрагмент (длина волны люминесценции 538 нм). При изменении концентрации сАМР изменяется соотношение интенсивности люминесценции на длинах волн 613 и 538 нм, не зависящее от концентрации люциферина. *б* – Биосенсор на окислительное повреждение ДНК. Один фрагмент люциферазы соединяется с CpG-связывающим доменом MBD1, а другой – с 8-оксогуанин-связывающим доменом OGG1. Окислительное повреждение ДНК приводит к образованию 8-оксогуанина, с которым связывается OGG1, сближая фрагменты люциферазы. *в* – Репортерная система для тестирования способности фактора транскрипции (ТФ?) связываться с определенной нуклеотидной последовательностью (ТБС). ТФ соединяется с малым фрагментом сплит-флуоресцентного белка sfGFP (11 sfGFP), большого фрагмента которого (1–10 sfGFP) соединяется с белком оболочки бактериофага MS2. MS2 узнает и связывается с расположенным рядом с ТБС сайтом связывания MS2-BS, что приводит к заякориванию 1–10 sfGFP вблизи изучаемого участка ДНК. Если ТФ связывается с ТБС, то фрагменты sfGFP сближаются и комплементируют с образованием активного sfGFP.

затуханию сигнала. Связанные с этим сложности регистрации динамики изменения активности репортерного белка и сопоставления данных, полученных в ходе независимых опытов, стимулировали создание многоцветных люциферазных репортерных систем [26]. Примером такой системы служит люциферазный сенсор для измерения концентрации внутриклеточного сАМР. В этом сенсоре используется способность С-концевого домена люциферазы жука-щелкуна взаимодействовать с различными N-концевыми доменами, которые определяют длину волны люминесценции. Два различных N-концевых домена люциферазы и ее С-концевой домен соединяются с сАМР-связывающим доменом протеинкиназы А (РКА) таким образом, чтобы в отсутствие сАМР С-концевой домен взаимодействовал с N-концевым доменом, характеризующимся красной люминесценцией (613 нм). После связывания сАМР конформация репортерного белка изменяется, С-концевой домен люциферазы начинает взаимодействовать с альтернативным N-концевым доменом, обладающим зеленой люминесценцией (538 нм) (рис. 5*а*). Изменение концентрации сАМР приводит к изменению соотношения красной и зеленой люминесценции, которое не зависит от концентрации субстрата или кофакторов [27].

Недостатком люцифераз светлячка и жука-щелкуна, пригодных для создания многоцветных

репортерных конструкций, является их большой размер. Присоединение крупных фрагментов (400 и 150 аминокислотных остатков) к небольшим исследуемым белкам может влиять на их внутриклеточное распределение и функции. Существуют более компактные сплит-люциферазы, лишенные этого недостатка. Так гуманизованная люцифераза веслоногого рачка *G. princeps* (hGluc) имеет небольшой размер и высокую удельную люминесценцию. SLCA-система на основе hGluc состоит из двух приблизительно равных по размеру фрагментов (~90 аминокислотных остатков), а ее удельная люминесценция равна примерно 10% активности целой hGluc [25].

SLCA-репортерные системы применяются для наблюдения за взаимодействием как клеточных [28], так и вирусных белков [29]. В опытах с  $\beta$ -амилоидом, мечеными фрагментами люциферазы, показано, что SLCA-системы можно использовать для регистрации олигомеризации (агрегации) изучаемого белка [30].

Одно из перспективных применений комплементационных репортеров – системы, позволяющие регистрировать активацию специфических протеаз. С этой целью половинки комплементационного репортерного белка соединяются с искусственными пептидами, которые образуют суперспиральную структуру из двух  $\alpha$ -спиралей, А и В, связанных участком, содержащим сайт рас-



щепления изучаемой протеазой. Одна половина репортерного белка присоединяется к N-, а другая – к C-концу суперспирального пептида. Пока протеаза не активна, суперспирально-сложенные пептиды, пришитые к половинкам репортерного белка, не могут взаимодействовать. При активации протеазы связь между двумя  $\alpha$ -спиралями расщепляется, и суперспиральные структуры обоих пептидов утрачивают стабильность. Теперь к одной половине репортерного белка пришитой оказывается только  $\alpha$ -спираль А, а к другой – только  $\alpha$ -спираль В. Обе  $\alpha$ -спирали могут снова спонтанно соединиться, что приведет к воссоединению половинок репортерного белка и его активации. Один и тот же репортерный белок может реагировать на активацию двух различных протеаз, если между  $\alpha$ -спиралями, пришитыми к его половинкам, вставлены участки, несущие сайты расщепления двух разных протеаз (рис. 3б, 1) [31].

SLCA- системы могут использоваться и для регистрации образования нуклеопротеидных комплексов. Для этого фрагменты люциферазы соединяют с белками, способными связываться с одним и тем же участком ДНК или РНК. В качестве примера остроумной реализации этой идеи можно привести биосенсор на окислительное повреждение ДНК. Этот биосенсор состоит из двух белков – фермента специфической репарации 8-оксигуанина OGG1, слитого с C-концевым фрагментом люциферазы светлячка, и N-концевого фрагмента люциферазы, слитого с фрагментом белка, содержащего метил-CpG-связывающий домен (MBD1) (рис. 5б). Под действием окислительного стресса образуется 8-оксигуанин, который стимулирует колокализацию обеих частей биосенсора на поврежденных CpG-участках ДНК с последующей активацией люциферазы.

Аналогично устроен и биосенсор на УФ-повреждение ДНК. В этом сенсоре C-концевой фрагмент люциферазы слит с белком DBB2, избирательно связывающимся с 6,4-пиримидин-пиримидоновыми димерами, которые образуются в результате фотоповреждения ДНК. В этом случае используется тот же вариант белка, содержащего N-концевой фрагмент люциферазы, что и в биосенсоре на окислительное повреждение ДНК [32].

### РЕПОРТЕРНЫЕ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ

Репортерные системы, основанные на флуоресцентной комплементации (BiFC, bimolecular fluorescent complementation), чрезвычайно удобны в применении. В них используются белки, которые не обладают ферментативной активностью, не являются субстратами ферментов, а построены они по тому же принципу, что и другие комплементационные репортерные белки. Флуоресцентный белок разрезается на неактивные половинки, способные при сближении восстанавливать вторичную струк-

туру и флуоресцентную активность. Такие нефлуоресцентные половинки соединяют с изучаемыми белками, а появление флуоресценции свидетельствует о взаимодействии данных белков.

По такому принципу созданы BiFC-системы на основе мономерных синих, голубых, зеленых, желтых и красных флуоресцентных белков [5]. Из них наиболее широко используются системы на основе желтого (Venus) и голубого (Cerulean) флуоресцентных белков. В отличие от многих других подходов для проведения измерений с использованием BiFC-системы не требуются дополнительные обработки: окрашивание, введение репортерных субстратов или лигандов. Все это повышает достоверность получаемых результатов [33].

Преимущество BiFC-систем состоит в количественной корреляции между флуоресцентным сигналом и интенсивностью взаимодействия анализируемых белков. Регистрируя изменения флуоресценции, можно изучать влияние мутаций, вводимых в структуру белка, на его способность взаимодействовать со своим партнером. Таким образом, метод флуоресцентной комплементации позволяет осуществлять тонкое картирование функциональных доменов белка [34].

К достоинствам BiFC-систем можно отнести их удобство для определения внутриклеточной локализации белковых комплексов, поскольку все наблюдения можно проводить в живой клетке с помощью флуоресцентного микроскопа. По сравнению с FRET (fluorescence resonance energy transfer), другим популярным флуоресцентным методом определения локализации, системы BiFC не нуждаются в сложном и дорогом специальном оборудовании. В FRET-системах используется способность флуорохромов к прямому переносу энергии с возбужденного флуорохрома-донора на флуорохром-акцептор, если спектр флуоресценции первого хотя бы частично совпадает со спектром возбуждения второго, и если оба флуорохрома находятся в непосредственной близости (в пределах форстеровского радиуса). У существующих FRET-пар флуоресцентных белков форстеровский радиус равен 2–6 нм, что зачастую недостаточно для определения взаимодействия белков, входящих в крупные многокомпонентные комплексы. Для BiFC-систем характерна способность восстанавливать флуоресцентные свойства при сближении фрагментов белка на расстояние до 10 нм [2], что позволяет регистрировать взаимодействие двух белков, даже не прямое, а опосредованное третьим, адаптерным, белком.

Существенный недостаток BiFC-систем – необратимость комплементации фрагментов флуоресцентных белков. Предпринимаются попытки создания мутантных вариантов сплит-флуоресцентных белков, в которых взаимное сродство субъединиц искусственно уменьшено [5], однако, BiFC-системы пока не позволяют достоверно

оценивать динамику образования и распада белковых комплексов, поскольку константа диссоциации фрагментов мутантного флуоресцентного белка существенно ниже, чем константа их ассоциации [13]. Это же обстоятельство может обернуться преимуществом, поскольку следующее за образованием исследуемого комплекса накопление флуоресцирующих молекул позволяет регистрировать очень слабые взаимодействия между белками.

Созревание активного флуоресцентного белка, происходящее после воссоединения двух неактивных половин, требует времени (десяtkи минут или даже часы, в зависимости от репортерного белка). В связи с этим ViFC-системы не могут использоваться для наблюдения за краткосрочной кинетикой взаимодействия между белками [2]. Эта проблема частично решена в репортерных системах на основе “быстро сворачивающегося” GFP (superfolder GFP, sfGFP).

Изучать динамику конкурентного замещения одного белкового лиганда другим, а также трех- и четырехкомпонентные белковые комплексы можно с использованием многоцветной флуоресцентной комплементации. Спектральные свойства флуоресцентного белка определяются структурой его N-концевого домена, поэтому, присоединив N-концевые домены двух различных флуоресцентных белков (например, желтого Venus и голубого Cerulean) к двум разным лигандам одного рецептора, а C-концевой домен одного флуоресцентного белка к самому белку-мишени, по спектральным свойствам флуоресцентного сигнала можно определить, какой из лигандов связывается с белком-мишенью (рис. 6) [35, 36].

Отдельно от прочих ViFC-репортеров стоят системы, в которых используется sfGFP. SfGFP создан на основе модифицированного GFP (EGFP), чтобы улучшить способность EGFP, слитого со слабоструктурированными белками, формировать активную вторичную структуру [37]. Вторичная структура sfGFP отличается повышенной устойчивостью, а сам хромофор имеет весьма короткое время созревания [38]. Сплит-флуоресцентный репортер на основе sfGFP состоит из крупного N-концевого фрагмента, содержащего первые 10  $\beta$ -слоев, формирующих флуоресцентный домен, и небольшого (15 аминокислотных остатков) C-концевого фрагмента, содержащего последний, 11-й,  $\beta$ -слой [39]. Разделение sfGFP на два неравновеликих фрагмента привело к тому, что сплит-sfGFP обладает гораздо более высокой склонностью к спонтанной самосборке, чем разделенные примерно посередине сплит-флуоресцентные Venus и Cerulean, что отрицательно сказывается на уровне его фоновой активности [40]. С другой стороны, компактный C-концевой фрагмент sfGFP более удобен для мечения небольших белков, поскольку он может не так сильно влиять на их функции. Создан также мо-

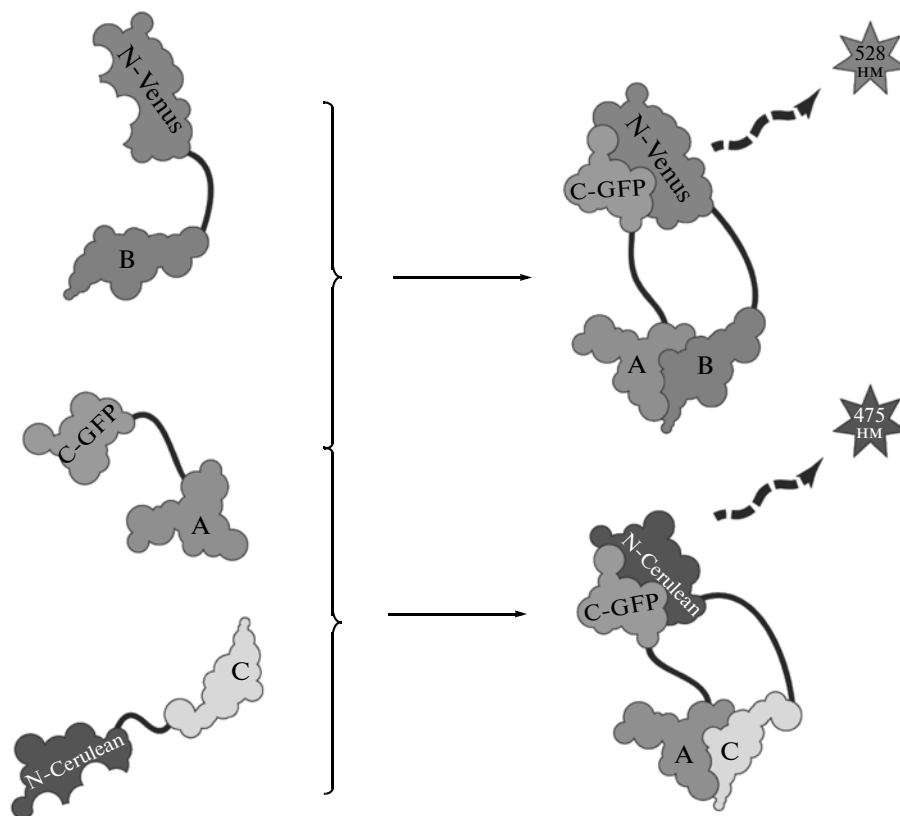
дифицированный вариант сплит-sfGFP, у которого снижена способность к спонтанной комплементации и, как следствие, понижен уровень фоновой активности [41].

ViFC-репортерные системы могут применяться и для наблюдений за взаимодействием клеточных рецепторов с небелковыми молекулами. Так, в ViFC-биосенсоре на вещества с эстрогенной активностью используется способность рецептора эстрогенов  $\alpha$  ( $\alpha$ -ER) изменять конформацию при связывании с лигандом. На N-конец фрагмента  $\alpha$ -ER помещается N-концевая часть сплит-флуоресцентного белка, а на C-конец — его C-концевая часть. В отсутствие лиганда N- и C-концевые фрагменты флуоресцентного репортерного белка существенно удалены друг от друга и неактивны. После присоединения лиганда, 17 $\beta$ -эстрадиола или его аналога, конформация рецептора изменяется таким образом, что соединенные с ним репортерные фрагменты сближаются, вызывая флуоресценцию [42]. Таким же образом путем соединения фрагментов флуоресцентного белка с мальтозосвязывающим белком сконструирован биосенсор, реагирующий на концентрацию мальтозы [43].

Помимо небелковых лигандов, партнерами ViFC-меченых белков могут быть и крупные небелковые молекулы. Так, в клетках, экспрессирующие ViFC-меченый белок оболочки бактериофага MS2 и исследуемый белок, вводили мРНК, содержащую участок связывания белка бактериофага и потенциальный участок связывания изучаемого белка. Если изучаемый белок взаимодействовал с участком мРНК, он оказывался вблизи ViFC-меченого белка бактериофага, что восстанавливало флуоресцентные свойства репортера (рис. 5в) [44]. При помощи ViFC-меченых синтетических белков, узнающих специфические нуклеотидные последовательности, удалось проследить внутриклеточное перемещение эндогенной митохондриальной ДНК в клетках, подвергнутых окислительному стрессу [45].

С целью изучения мембранной топологии трансмембранного белка, а также конформационных изменений белков-рецепторов в ответ на присоединение лиганда фрагменты флуоресцентного репортерного белка размещают на их N- и C-концах [46].

Появление сплит-флуоресцентных белков, состоящих из крупной неактивной части и существенно меньшей части активатора флуоресценции, позволяет использовать ViFC для комплемент-активируемой световой микроскопии (CALM) и даже молекулярной микроскопии. Для отображения поверхностных белков клетки и динамики их интернализации к изучаемому белку присоединяют большую субъединицу репортера и экспрессируют такую конструкцию в клетке. Непосредственно перед получением изображения клетки инкубируют в среде с до-



**Рис. 6.** Многоцветное мечение для обнаружения взаимодействия белка А с разными мишенями. Белок А сливается с С-концевым фрагментом флуоресцентного белка, а белки-мишени В и С — с N-концевыми фрагментами флуоресцентных белков Venus и Cerulean. При взаимодействии А с В восстанавливается активный Venus, флуоресцирующий с пиком при 528 нм, а при взаимодействии А с С — активный Cerulean, флуоресценция которого достигает пика при 475 нм.

бавлением короткого фрагмента репортерного белка. В результате можно визуализировать меченый белок, находящийся на поверхности клетки. Аналогичным образом можно наблюдать и внутриклеточные молекулы. С этой целью короткий фрагмент репортерного белка вводят в клетку либо микроинъекцией, либо сливают с проникающим в клетку пептидом. Для проведения молекулярной микроскопии необходимо, чтобы клетка содержала крайне незначительное число флуоресцентных молекул. Традиционно для этого используется либо продолжительная фотоинаktivация флуоресцентно меченных белков, либо гены этих белков экспрессируют под контролем слабых промоторов. Использование ViFC позволяет исключить потенциальные стрессовые воздействия фотоинаktivации и предоставляет более широкие возможности для регуляции концентрации флуоресцентных молекул [47].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для изучения белок-белковых взаимодействий, клеточных сигнальных и метаболических путей, механизмов канцерогенеза и других про-

блем с использованием систем на основе белковой комплементации необходим широкий спектр сплит-репортерных белков. Очевидно, что разноплановость задач не позволяет создать универсальную репортерную систему. Вместе с тем, устранение недостатков каждого конкретного репортерного белка позволяет адаптировать их к более широкому кругу задач. В настоящее время интенсивно разрабатываются репортерные системы на основе люцифераз и ViFC, которые взаимно дополняют друг друга и пригодны для решения большинства типичных задач в области межбелковых взаимодействий. Люциферазные и ViFC-репортерные системы совершенствуются в двух основных направлениях. Одно предусматривает создание систем, позволяющих регистрировать взаимодействие более двух белков одновременно, т.е. конкурентное связывание с общей мишенью, образование тройных комплексов и т.д. Другое направление предполагает создание репортерных систем, минимально влияющих на способность белка взаимодействовать со своими партнерами и перемещаться между клеточными структурами. В случае одного гипотетического сигнального пути первый подход более удобен для изучения ключевых компонентов, взаимодействующих с различ-

ными белками. Второй же подход необходим при изучении тех компонентов сигнального пути, которые имеют небольшой размер или активно перемещаются между клеточными структурами.

Возможности уже созданных комплементационных репортерных систем позволяют выполнять задачи, далеко выходящие за рамки простой регистрации взаимодействий двух и более белков. Система, включающая несколько комплементационных репортерных белков, “чувствующих” взаимодействие различных пар белков, может применяться для функционального картирования сигнального пути — определения порядка передачи сигнала между многими белками, этапов сигнального пути, на которых регулируется передача сигнала или взаимодействия между разными сигнальными путями. Таким же образом можно определить механизм действия химических соединений, влияющих на передачу сигнала, установить их точную мишень, обнаружить возможные побочные взаимодействия [48, 49]. Возможным становится проведение обратного скрининга — вещества, обладающие хорошо известной активностью, могут подвергаться скринингу на библиотеке комплементационных репортеров для определения их мишеней и механизмов действия.

Не менее перспективно и использование репортерных систем на основе белковой комплементации для получения мутантных белков с заданными свойствами — способностью связываться с одними белками-мишенями или не взаимодействовать с другими. Это также открывает возможность создания искусственных белков с заданными функциями [21]. Такой подход будет востребован не только для изучения функционирования белковых доменов, но и для создания новых лекарственных средств, эффективных при различных патологиях.

Наконец, как следует из результатов работ по созданию сплит-убиквитиновых и сплит-протеазных систем, применение сплит-ферментов позволит создавать и вводить в клетки искусственные сигнальные пути, предназначенные как для комплексного исследования клеточных функций, так и для придания клеткам новых свойств и функций.

Работа выполнена при поддержке государственных контрактов № 16.740.11.0637 (С.П.Ч.) и № П11051 (Ю.Е.К.) в рамках мероприятий Федеральной целевой программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 годы, Российского фонда фундаментальных исследований (10-04-00370-а (Ю.Е.К.), 11-04-00410, 11-04-92697 (П.М.Ч.)), гранта Президента Российской Федерации для поддержки молодых российских ученых (Ю.Е.К.), программы “Молекулярная и клеточная биология” (Ю.Е.К. и П.М.Ч.), договора Министерства образования и

науки по постановлению Правительства РФ № 220-11.Г34.31.0034 (П.М.Ч.) и грантов Национальных институтов здоровья США (R01 AG25278 (П.М.Ч.)).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Johnsson N., Varshavsky A. 1994. Split ubiquitin as a sensor of protein interactions *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**, 10340–10344.
2. Hu C.D., Chinenov Y., Kerppola T.K. 2002. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol. Cell*. **9**, 789–798.
3. Jach G., Pesch M., Richter K., et al. 2006. An improved mRFP1 adds red to bimolecular fluorescence complementation. *Nat. Meth.* **3**, 597–600.
4. Hu C.D., Kerppola T.K. 2003. Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nat. Biotechnol.* **21**, 539–545.
5. Kodama Y., Hu C.D. 2010. An improved bimolecular fluorescence complementation assay with a high signal-to-noise ratio. *Biotechniques*. **49**, 793–805.
6. Pelletier J.N., Campbell-Valois F.X., Michnick S.W. 1998. Oligomerization domain-directed reassembly of active dihydrofolate reductase from rationally designed fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 12141–12146.
7. Galarneau A., Primeau M., Trudeau L.E., Michnick S.W. 2002. Beta-lactamase protein fragment complementation assays as *in vivo* and *in vitro* sensors of protein-protein interactions. *Nat. Biotechnol.* **20**, 619–622.
8. Moosmann P., Rusconi S. 1996. Alpha complementation of LacZ in mammalian cells. *Nucl. Acids Res.* **24**, 1171–1172.
9. Чумаков С.П., Ильинская Г.В., Кравченко Ю.Е., и др. 2008. Система для количественного определения внутриклеточных перемещений рекомбинантных белков на основе лентивирусных векторов. *Молекуляр. биология*. **42**, 1004–1011.
10. Wehr M.C., Laage R., Bolz U., et al. 2006. Monitoring regulated protein-protein interactions using split TEV. *Nat. Meth.* **3**, 985–993.
11. Paulmurugan R., Gambhir S.S. 2003. Monitoring protein-protein interactions using split synthetic renilla luciferase protein-fragment-assisted complementation. *Anal. Chem.* **75**, 1584–1589.
12. Wittke S., Lewke N., Muller S., Johnsson N. 1999. Probing the molecular environment of membrane proteins *in vivo*. *Mol. Biol. Cell*. **10**, 2519–2530.
13. Pusch S., Dissmeyer N., Schnittger A. 2011. Bimolecular-fluorescence complementation assay to monitor kinase-substrate interactions *in vivo*. *Meth. Mol. Biol.* **779**, 245–257.
14. Shekhawat S.S., Ghosh I. 2011. Split-protein systems: beyond binary protein-protein interactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **15**, 789–797.
15. Pratt M.R., Schwartz E.C., Muir T.W. 2007. Small-molecule-mediated rescue of protein function by an inducible proteolytic shunt. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104**, 11209–11214.
16. Broome A.M., Bhavsar N., Ramamurthy G., et al. 2010. Expanding the utility of beta-galactosidase com-

- plementation: piece by piece. *Mol. Pharmacol.* **7**, 60–74.
17. Massoud T.F., Paulmurugan R., Gambhir S.S. 2010. A molecularly engineered split reporter for imaging protein-protein interactions with positron emission tomography. *Nat. Med.* **16**, 921–926.
  18. Nguyen P.Q., Silberg J.J. 2010. A selection that reports on protein-protein interactions within a thermophilic bacterium. *Protein Eng. Des. Sel.* **23**, 529–536.
  19. Hirrlinger J., Requardt R.P., Winkler U., et al. 2009. Split-CreERT2: temporal control of DNA recombination mediated by split-Cre protein fragment complementation. *PLoS One.* **4**, e8354.
  20. Tarassov K., Messier V., Landry C.R., et al. 2008. An *in vivo* map of the yeast protein interactome. *Science.* **320**, 1465–1470.
  21. Michnick S.W., Ear P.H., Landry C., et al. 2011. Protein-fragment complementation assays for large-scale analysis, functional dissection and dynamic studies of protein-protein interactions in living cells. *Meth. Mol. Biol.* **756**, 395–425.
  22. Ozawa T., Kaihara A., Sato M., et al. 2001. Split luciferase as an optical probe for detecting protein-protein interactions in mammalian cells based on protein splicing. *Anal. Chem.* **73**, 2516–2521.
  23. Kim S.B., Otani Y., Umezawa Y., Tao H. 2007. Bioluminescent indicator for determining protein-protein interactions using intramolecular complementation of split click beetle luciferase. *Anal. Chem.* **79**, 4820–4826.
  24. Silva Neto A.J., Scorsato V., Arnoldi F.G., Viviani V.R. 2009. *Pyrearinus termitilluminans* larval click beetle luciferase: active site properties, structure and function relationships and comparison with other beetle luciferases. *Photochem. Photobiol. Sci.* **8**, 1748–1754.
  25. Remy I., Michnick S.W. 2006. A highly sensitive protein-protein interaction assay based on *Gaussia* luciferase. *Nat. Meth.* **3**, 977–979.
  26. Hida N., Awais M., Takeuchi M., et al. 2009. High-sensitivity real-time imaging of dual protein-protein interactions in living subjects using multicolor luciferases. *PLoS One.* **4**, e5868.
  27. Takeuchi M., Nagaoka Y., Yamada T., et al. 2010. Ratiometric bioluminescence indicators for monitoring cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in live cells based on luciferase-fragment complementation. *Anal. Chem.* **82**, 9306–9313.
  28. Ilagan M.X., Lim S., Fulbright M., et al. 2011. Real-time imaging of Notch activation with a luciferase complementation-based reporter. *Sci. Signal.* **4**, rs7.
  29. Deng Q., Wang D., Xiang X., et al. 2011. Application of a split luciferase complementation assay for the detection of viral protein-protein interactions. *J. Virol. Meth.* **176**, 108–111.
  30. Hashimoto T., Adams K.W., Fan Z., et al. 2011. Characterization of oligomer formation of amyloid-beta peptide using a split-luciferase complementation assay. *J. Biol. Chem.* **286**, 27081–27091.
  31. Shekhawat S.S., Porter J.R., Sriprasad A., Ghosh I. 2009. An autoinhibited coiled-coil design strategy for split-protein protease sensors. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 15284–15290.
  32. Furman J.L., Mok P.W., Badran A.H., Ghosh I. 2011. Turn-on DNA damage sensors for the direct detection of 8-oxoguanine and photoproducts in native DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 12518–12527.
  33. Hernandez F.P., Sandri-Goldin R.M. 2011. Bimolecular fluorescence complementation analysis to reveal protein interactions in herpes virus infected cells. *Methods.* **55**, 182–187.
  34. Morell M., Ventura S., Aviles F.X. 2009. Protein complementation assays: approaches for the *in vivo* analysis of protein interactions. *FEBS Lett.* **583**, 1684–1691.
  35. Kerppola T.K. 2008. Bimolecular fluorescence complementation: visualization of molecular interactions in living cells. *Meth. Cell Biol.* **85**, 431–470.
  36. Vidi P.A., Ejendal K.F., Przybyla J.A., Watts V.J. 2011. Fluorescent protein complementation assays: new tools to study G protein-coupled receptor oligomerization and GPCR-mediated signaling. *Mol. Cell. Endocrinol.* **331**, 185–193.
  37. Pedelacq J.D., Cabantous S., Tran T., et al. 2006. Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* **24**, 79–88.
  38. Andrews B.T., Schoenfish A.R., Roy M., et al. 2007. The rough energy landscape of superfolder GFP is linked to the chromophore. *J. Mol. Biol.* **373**, 476–490.
  39. Kaddoum L., Magdeleine E., Waldo G.S., et al. 2010. One-step split GFP staining for sensitive protein detection and localization in mammalian cells. *Biotechniques.* **49**, 727–728, 730, 732 passim.
  40. Cabantous S., Terwilliger T.C., Waldo G.S. 2005. Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* **23**, 102–107.
  41. Zhou J., Lin J., Zhou C., et al. 2011. An improved bimolecular fluorescence complementation tool based on superfolder green fluorescent protein. *Acta Biochim. Biophys. Sin (Shanghai).* **43**, 239–244.
  42. McLachlan M.J., Katzenellenbogen J.A., Zhao H. 2011. A new fluorescence complementation biosensor for detection of estrogenic compounds. *Biotechnol. Bioeng.* **108**, 2794–2803.
  43. Jeong J., Kim S.K., Ahn J., et al. 2006. Monitoring of conformational change in maltose binding protein using split green fluorescent protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **339**, 647–651.
  44. Rackham O., Brown C.M. 2004. Visualization of RNA-protein interactions in living cells: FMRP and IMP1 interact on mRNAs. *EMBO J.* **23**, 3346–3355.
  45. Cheong C.G., Hall T.M. 2006. Engineering RNA sequence specificity of Pumilio repeats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**, 13635–13639.
  46. Benton R., Sachse S., Michnick S.W., Vosshall L.B. 2006. Atypical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors *in vivo*. *PLoS Biol.* **4**, e20.
  47. Pinaud F., Dahan M. 2011. Targeting and imaging single biomolecules in living cells by complementation-activated light microscopy with split-fluorescent proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**, E201–210.
  48. Michnick S.W., Ear P.H., Manderson E.N., et al. 2007. Universal strategies in research and drug discovery based on protein-fragment complementation assays. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 569–582.
  49. Michelini E., Cevenini L., Mezzanotte L., et al. Cell-based assays: fuelling drug discovery. *Anal. Bioanal. Chem.* **398**, 227–238.