



Mientras más, mejor: análisis de interacciones proteicas mediante fluorescencia

Montalvo-Méndez, Rubén; Jiménez-Mejía, Gustavo; Reséndez-Pérez, Diana
Mientras más, mejor: análisis de interacciones proteicas mediante fluorescencia
CIENCIA *ergo-sum*, vol. 31, 2024 | **e255**
Espacio del Divulgador

Universidad Autónoma del Estado de México, México

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivar 4.0 Internacional.



Montalvo-Méndez, R., Jiménez-Mejía, G. y Reséndez-Pérez, D. (2024). Mientras más, mejor: análisis de interacciones proteicas mediante fluorescencia. CIENCIA *ergo-sum*, 31. <http://doi.org/10.30878/ces.v31n0a40>

Mientras más, mejor: análisis de interacciones proteicas mediante fluorescencia

The more, the merrier: Fluorescence Analysis of Protein interactions

Rubén Montalvo-Méndez

Universidad Autónoma de Nuevo León, México

rmontalvom@uanl.edu.mx

 <http://orcid.org/0000-0002-0469-5562>

Recepción: 13 de febrero de 2023

Aprobación: 19 de mayo de 2023

Gustavo Jiménez-Mejía

Universidad Autónoma de Nuevo León, México

gjimenezm@uanl.edu.mx

 <http://orcid.org/0000-0003-1773-1400>

Diana Reséndez-Pérez*

Universidad Autónoma de Nuevo León, México

diana.resendezpr@uanl.edu.mx

 <http://orcid.org/0000-0002-4709-7677>

RESUMEN

En las últimas décadas se han desarrollado nuevas estrategias que permiten el análisis de interacciones proteicas sin alterar la estructura celular. El objetivo de esta revisión es mostrar un panorama general para el estudio de las interacciones proteína-proteína. Se comparan diferentes técnicas fluorescentes tanto de complementación como de transferencia de energía y su combinación. Se presentan ventajas, desventajas y aplicaciones novedosas en cultivo celular y en organismos vivos con un enfoque en el uso de fluorescencia, luminiscencia y su combinación para la detección de interacciones multiproteicas. La implementación de estrategias con marcaje fluorescente y luminiscente, así como sus ingeniosas combinaciones han desplazado las técnicas clásicas y permiten la detección más eficiente de complejos multiproteicos.

PALABRAS CLAVE: interacciones proteína-proteína, proteínas fluorescentes, BiFC, FRET, BiFC-FRET.

ABSTRACT

In recent decades, novel strategies have been developed to analyze protein-protein interactions without disrupting the cellular structure. This review shows an overview of these strategies. We compared different fluorescent techniques of molecular complementation and energy transfer, as well as their combination in the analysis of protein-protein interactions. Advantages and disadvantages are presented, as well as novel applications in cell culture and living organisms, focusing on fluorescence, luminescence, and their combination to detect multiproteic interactions. The application of genetic labeling with fluorescent and luminescent labels as well as their creative combinations, have displaced the classic approaches, leading to the detection of multiprotein complexes.

KEYWORDS: protein-protein interactions, fluorescent proteins, BiFC, FRET, BiFC-FRET.

INTRODUCCIÓN

Las proteínas son elementos clave de la maquinaria celular, ya que participan en todos los procesos de mantenimiento y estructura, así como en funciones moleculares especializadas. La gran mayoría de las proteínas interactúan con otras para realizar funciones que incluyen el control de la expresión génica, transducción de señales,

*AUTORA PARA CORRESPONDENCIA

diana.resendezpr@uanl.edu.mx

motilidad, comunicación celular, entre otras. El estudio de las interacciones proteína-proteína (PPIs por sus siglas en inglés) ayuda a entender la función de las proteínas en la célula al determinar el complejo mapa de las interacciones llamado *interactoma*, así como los procesos en los que están involucradas. Las PPIs son tan importantes que distintas enfermedades tienen su base etiológica en mutaciones que las afectan en un nivel molecular; estas mutaciones son capaces de cambiar la estructura de las proteínas alterando su función o la forma en que interaccionan entre ellas. Tal situación se observa en enfermedades neurodegenerativas como las ataxias, Alzheimer o Parkinson e incluso en el desarrollo de neoplasias. Por esto, en las últimas décadas se ha incrementado el interés por el estudio de las PPIs, al igual que por el desarrollo de distintas estrategias metodológicas novedosas para su análisis en un ambiente controlado *in vitro*, dentro del organismo completo *in vivo* o mediante programas bioinformáticos *in silico* (Lage, 2014).

1. INTERACCIONES PROTEICAS DESDE LO CLÁSICO HASTA LA FLUORESCENCIA

Muchas estrategias para el estudio de PPIs se consideran estándares clásicos de la proteómica como los ensayos de precipitación *pull-down*, ensayos de cambio en movilidad electroforética (EMSA, del inglés Electromobility Shift Assay) y co-inmunoprecipitación (Co-IP). Aunque estas estrategias han sido ampliamente utilizadas en la descripción de una gran cantidad de interacciones, su principal desventaja radica en que es necesario romper las células de la muestra usando agentes que pueden comprometer la estructura de la proteína de interés. Además, estas técnicas no muestran la localización intracelular donde ocurre la interacción (Ciruela, 2008).

Para realizar de forma más eficiente la identificación de PPIs se han desarrollado estrategias basadas en la complementación molecular en donde una proteína reportera se divide en dos fragmentos, y cada uno es fusionado a una proteína de interés. La interacción de estas dos proteínas de fusión permite la complementación molecular de ambos fragmentos, que indican la interacción. Los ensayos de complementación molecular utilizan enzimas, factores transcripcionales o proteínas fluorescentes para identificar las interacciones sin necesidad de romper las células.

La mayoría de los trabajos descritos con técnicas de complementación molecular analizan las interacciones entre dos proteínas; sin embargo, en las últimas décadas se ha realizado un gran esfuerzo para mejorar el estudio de PPIs mediante estrategias fluorescentes como Complementación Bimolecular Fluorescente (BiFC, del inglés Bimolecular Fluorescence Complementation). Incluso, se ha buscado implementar estrategias que permitan estudiar interacciones entre tres o cuatro proteínas mediante la combinación de BiFC y Transferencia de Energía por Resonancia entre Fluoróforos (FRET, del inglés Fluorescence Resonance Energy Transfer).

2. COMPLEMENTACIÓN MOLECULAR PARA DETECCIÓN DE INTERACCIONES PROTEICAS

Otra estrategia clásica en el estudio de las PPIs es el ensayo de doble híbrido (Y2H, del inglés Yeast Two Hybrid). Esta técnica se fundamenta en que el factor de transcripción Gal4 puede unirse a los sitios de regulación UAS (Upstream Activation Sequence) y activa la transcripción de un gen reportero como β -galactosidasa (β -gal), luciferasa o la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés Green Fluorescent Protein). La técnica consiste en partir a Gal4 en dos fragmentos, el dominio activador (DA) y el dominio de unión al DNA (DUD) para inactivar su función transcripcional. Cuando estos fragmentos se fusionan a dos proteínas que interaccionan, el factor transcripcional se reconstituye y activa la expresión de un gen reportero regulado por sitios UAS, cuya expresión indica la interacción de las proteínas (figura 1a) (Paiano *et al.*, 2019). Esta estrategia se ha implementado con éxito en el tamizaje a gran escala de interacciones en proteínas de virus, bacterias, levaduras, protozoarios, nematodos, insectos y humanos (Parrish *et al.*, 2006). Debido a que el ensayo Y2H se basa en la activación de un gen reportero en el núcleo tiene algunas desventajas, tales como la posible participación de represores transcripcionales y la autoactivación del gen reportero por el dominio

de unión al DNA anclado a una proteína de interés y a que algunas proteínas citosólicas deben importarse al núcleo para su análisis (Causier y Davies, 2002). Para resolver esas dificultades, hay algunas propuestas de ensayos de Y2H que no dependen de una actividad transcripcional sino de la activación de una vía de señalización citosólica que rescata una cepa de levadura sensible a la temperatura (Aronheim *et al.*, 1997; Broder *et al.*, 1998). También existen adaptaciones de Y2H donde cada proteína se fusiona a un fragmento de la ubiquitina y si ambas proteínas de fusión interactúan ocurre un corte proteolítico mediante una proteasa específica liberando a la proteína, que se visualiza mediante SDS-PAGE (Johnsson y Varshavsky, 1994), o incluso se puede usar un factor de transcripción que se transloca al núcleo y activa la expresión de un gen reportero (Thaminy *et al.*, 2004).

A finales de los noventa se desarrollaron las primeras estrategias de complementación molecular enzimática para la detección de PPIs en la célula. La enzima β -gal de *Escherichia coli* fue una de las primeras adaptadas para detectar interacciones proteicas, donde se fusionan dos fragmentos mutantes de β -gal ($\Delta\alpha$ y $\Delta\omega$) a dos proteínas de interés. Si las proteínas interactúan, la función enzimática se restablece e hidroliza el sustrato X-Gal o Fluor-X-Gal para generar una coloración azul o fluorescencia roja que indica la interacción proteica (figura 1b) (Rossi *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2020). Una ventaja de esta técnica es que se puede llevar a cabo en cualquier tipo celular y que las interacciones que se van a probar se dirigirán a algún compartimento celular específico, mientras que una de sus principales limitaciones es que la enzima funcional es un homotetramero; algunos fragmentos de la enzima son de gran tamaño (80 kDa) y pueden generar un impedimento estérico (Rossi *et al.*, 1997). Esta estrategia se ha adaptado para identificar interacciones dimericas de la proteína Tau (Ding y Johnson, 2008) y a su vez se ha modificado para identificar la presencia de receptores implicados en el desarrollo del cáncer (Broome *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2020). La complementación de la enzima β -lactamasa (β -lac) también se ha utilizado para analizar PPIs, en la cual β -lac al complementarse, recupera su actividad e hidroliza el sustrato fluorescente CCF2/AM cambiando su fluorescencia de verde a azul (figura 1c) (Wehrman *et al.*, 2002; Galarneau *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2020). El uso de la complementación de esta enzima en células eucariotas tiene la ventaja de que no hay actividad de β -lac endógena, sus fragmentos son de tamaño pequeño (<19 kDa) y se han desarrollado estrategias de fluorescencia o colorimetría para evaluar su actividad con más facilidad (Wehrman *et al.*, 2002; Galarneau *et al.*, 2002). Esta técnica se ha utilizado para mapear epítopes reconocidos por anticuerpos específicos (Secco *et al.*, 2009) e incluso la complementación de esta enzima se ha implementado para determinar si una secuencia proveniente de una biblioteca se encuentra en marco de lectura (Verma *et al.*, 2020).

De forma similar, se desarrolló una alternativa de Complementación Bimolecular Luminiscente (BiLC, del inglés Bimolecular Luminescence Complementation), en la cual dos fragmentos de luciferasa –guion medio enzima responsable de la bioluminiscencia en luciérnagas y otros organismos– son fusionados a dos proteínas de interés; si las proteínas interactúan, se recupera la actividad enzimática de la luciferasa, que hidroliza su sustrato luciferina y genera luminiscencia (figura 1d) (Lang *et al.*, 2019; Verhoeef y Wade, 2017). Esta estrategia tiene la ventaja de que genera muy poco ruido de fondo debido a que no requiere de luz externa, tiene una alta sensibilidad y se utiliza para evaluar la asociación y disociación de proteínas, ya que la unión de los fragmentos de la luciferasa es reversible (Lang *et al.*, 2019). BiLC se ha utilizado exitosamente para develar PPIs de vías relacionadas con el cáncer, el Alzheimer, señalización en plantas, así como el estudio de moléculas que disrumen el ensamblaje de la polimerasa del virus de la influenza (Hida *et al.*, 2009; Hashimoto *et al.*, 2011; Gehl *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2017). Estos ejemplos, donde las PPIs se identifican por la recuperación de la actividad enzimática, requieren la adición de un sustrato externo y solo pueden aplicarse cuando las condiciones intracelulares no interfieren con la actividad enzimática o la formación del complejo. Las nuevas estrategias de complementación bimolecular no requieren la adición de sustratos específicos debido al uso de proteínas fluorescentes que requieren equipo especializado para detectar el marcaje que evidencia la interacción *in vivo*.

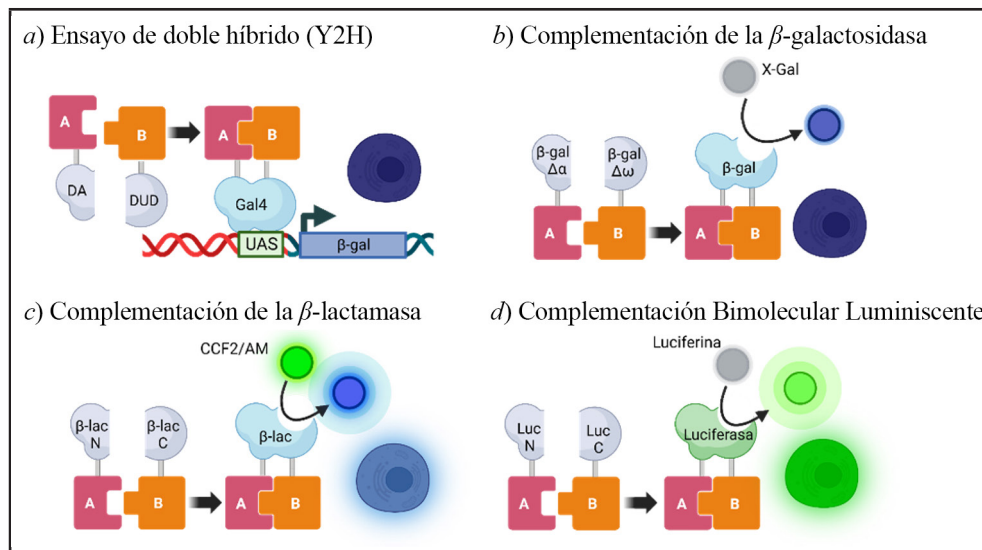


FIGURA 1

Técnicas basadas en complementación molecular de enzimas y factores de transcripción

a) En el ensayo de doble híbrido (Y2H) la proteína A se fusiona al dominio activador (DA) y la proteína B al dominio de unión al DNA (DUD) de Gal4. Si A interacciona con B Gal4 se complementa y puede unirse a los sitios UAS activando β -gal. b) En la complementación de la β -gal se fusionan dos fragmentos inactivos a las proteínas A y B. Si A interacciona con B, la enzima restablece su actividad e hidroliza X-Gal. c) En la complementación de β -lac se unen dos fragmentos de esta enzima a las proteínas A y B; si éstas interaccionan, la enzima se complementa e hidroliza CCF2/AM y cambia su fluorescencia de verde a azul. d) En la BiLC la luciferasa se parte en dos fragmentos que se fusionan a las proteínas A y B. Si estas proteínas interaccionan se recupera su actividad, hidroliza luciferina y genera luminiscencia.

Fuente: elaboración propia en BioRender.com.

3. COMPLEMENTACIÓN BIMOLECULAR FLUORESCENTE

La Complementación Bimolecular Fluorescente (BiFC) se ha utilizado ampliamente para determinar la interacción entre proteínas en su entorno “natural” intracelular, ya que no requiere extraer proteínas o añadir sustratos externos. Con el objetivo de llevar a cabo esta técnica, una proteína fluorescente se divide en dos y cada fragmento se fusiona a una proteína de interés; si las proteínas de interés interaccionan dentro de la célula, los fragmentos de la proteína fluorescente se unen, por lo que se restablece la señal fluorescente que indica la interacción entre las proteínas (figura 2a). El ensayo de BiFC ha logrado implementarse tanto en cultivo celular como en distintos organismos, entre los cuales están bacterias, plantas, levaduras, moscas y ratones, entre otros. En nuestro laboratorio hemos implementado la técnica de BiFC para determinar interacciones entre factores de transcripción basales como TBP y TFIIE β con las homeoproteínas Antp, Scr, Ubx, AbdA y AbdB (Altamirano-Torres *et al.*, 2018; Montalvo-Méndez, 2020; Jiménez-Mejía *et al.*, 2022). En los últimos años, incluso, ha sido posible construir bibliotecas génicas en *D. melanogaster* para llevar a cabo análisis de interacción y función de complejos proteicos a gran escala (Bischof *et al.*, 2018). Esta técnica también se ha utilizado para identificar interacciones diméricas simultáneas usando el enfoque de BiFC multicolor, en el cual las proteínas fluorescentes Venus y CFP (Cyan Fluorescent Protein) se parten en dos fragmentos amino y carboxilo (VN-VC y CN-CC respectivamente) y los fragmentos VN, VC y CC se fusionan a proteínas de interés. La interacción entre VN y VC restablece la fluorescencia de Venus y una interacción entre VN y CC restablece la fluorescencia de CFP. De esta manera, es posible detectar dos interacciones al mismo tiempo, al igual que su localización subcelular (figura 2b) (Jia *et al.*, 2021). Utilizando esta estrategia, recién se ha logrado elucidar la manera en la que interaccionan proteínas de la familia Bcl-2, implicadas en el proceso de permeabilización de la membrana mitocondrial durante la apoptosis (Gonzalo *et al.*, 2023). Adicionalmente, se ha desarrollado una técnica denominada *Complementación Fluorescente de Tres Fragmentos* (TF3FC, del inglés Three Fragment Fluorescence

Complementation), en donde la proteína fluorescente Venus se divide en tres fragmentos (VN154, VN155-172 y VC173) y cada uno se fusiona a una proteína de interés. Si estas proteínas interaccionan, los tres fragmentos de Venus se unen, por lo que a su vez restablecen la fluorescencia y evidencian la interacción trimérica (figura 2c) (Chen *et al.*, 2018). Esta estrategia se utilizó con éxito para determinar la unión de las enzimas CS1, AP1 y GPS, implicadas en la vía del ácido itacónico (Yang *et al.*, 2018). En conjunto, las técnicas de complementación molecular son ventajosas comparadas con las tradicionales, dado que permiten la visualización *in vivo* de la interacción, además de su localización subcelular. Sin embargo, requieren un cuidadoso diseño al momento de generar las proteínas de fusión debido a su topología, ya que ocasionaría un impedimento estérico que comprometa la función de las proteínas o su interacción. Además, al requerir una fuente externa de luz puede producirse ruido de fondo que interfiera con el análisis (Kerppola *et al.*, 2008; Renna *et al.*, 2018); esto se vuelve más complicado si se desea analizar una interacción constituida por más de dos proteínas.

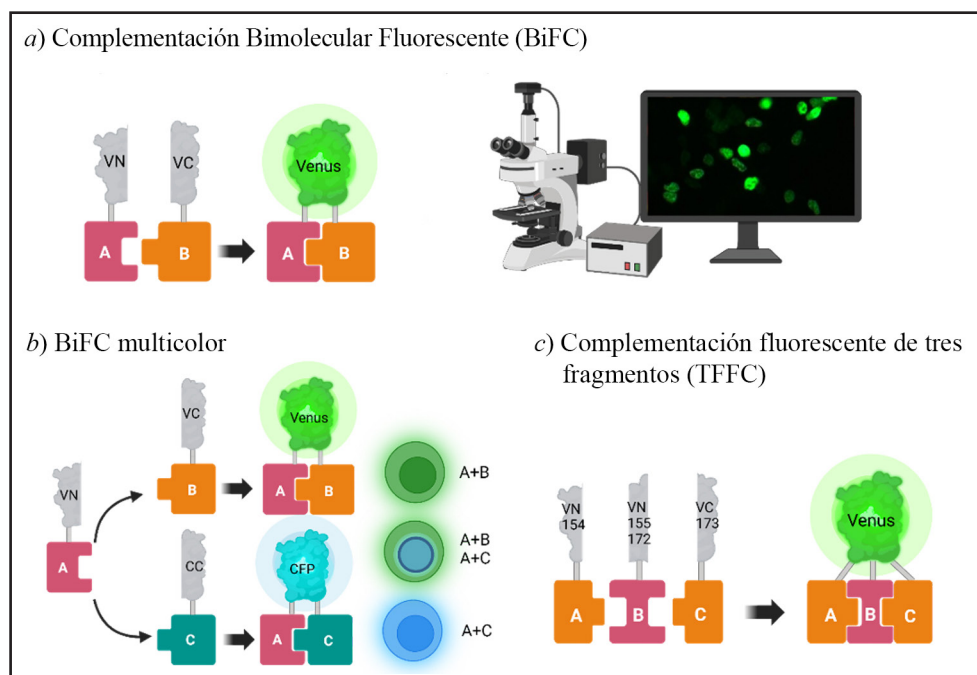


FIGURA 2

Técnicas de complementación fluorescente para detección de interacciones diméricas y triméricas

a) Izquierda: en la interacción mediante BiFC las proteínas A y B se fusionan a los fragmentos amino (VN) y carboxilo (VC) de Venus respectivamente; si ambas proteínas interaccionan los fragmentos de Venus se unen y la fluorescencia se restablece. Derecha: se muestra la reconstitución de Venus en células mediante BiFC utilizando microscopía de fluorescencia. b) En el BiFC multicolor las proteínas A y B se fusionan a VN y VC de Venus y la proteína C se une al extremo carboxilo (CC) de CFP. Si A interacciona con B, Venus fluoresce y si A interacciona con C, CFP fluoresce. Si la proteína A interacciona con B y con C se restablece la fluorescencia de Venus y CFP, lo que permite identificar el sitio donde ocurre cada interacción. c) En TFFC, Venus se divide en tres fragmentos que se fusionan a las proteínas A, B y C. La fluorescencia de Venus se restablece si las proteínas A, B y C interaccionan.

Fuente: elaboración propia en BioRender.com.

4. TRANSFERENCIA DE ENERGÍA POR RESONANCIA

Existen otras estrategias para identificar interacciones proteína-proteína basadas en la Transferencia de Energía por Resonancia (RET, del inglés Resonance Energy Transfer). En estas técnicas se fusionan ya sea dos proteínas fluorescentes o una luciferasa y una proteína fluorescente a dos proteínas de interés. Si las proteínas interaccionan o se encuentran a una distancia menor de 10 nm, habrá transferencia de energía entre la molécula donadora y aceptora, siempre y cuando la longitud de onda de emisión y excitación se traslapen (figura 3a) (Hohlbein *et al.*, 2014).

Los fluoróforos más utilizados para la técnica de Transferencia de Energía por Resonancia de Förster (FRET por sus siglas en inglés) son las proteínas CFP y Venus, donde la emisión de CFP promueve la fluorescencia de Venus (figura 3b). Esta estrategia se ha utilizado para determinar interacciones proteína-proteína en el diseño de biosensores intracelulares y hasta para medir distancias moleculares (Imani *et al.*, 2021; Szalai *et al.*, 2021; Peter *et al.*, 2022). Otra técnica basada en el mismo principio es (BRET, del inglés Bioluminescence Resonance Energy Transfer), donde la molécula donadora es la luciferasa. Cuando esta enzima hidroliza su sustrato, se emite una longitud de onda similar al rango espectral de excitación de Venus promoviendo su fluorescencia (figura 3c). La principal ventaja de esta técnica se debe a que el donador no requiere una luz adicional para su excitación; por lo tanto, se evita la fototoxicidad y autofluorescencia. Esta estrategia se ha utilizado para determinar la actividad de proteínas modificadas, proteínas accesorias como la β -arrestina, así como en ensayos de unión de ligandos (Kobayashi *et al.*, 2019). Las técnicas de transferencia de energía han resultado ser una poderosa herramienta; sin embargo, debido a la naturaleza del ensayo es fundamental tomar en cuenta la topología apropiada que permita la interacción proteína-proteína sin impedir la transferencia de energía entre aceptor y donador.

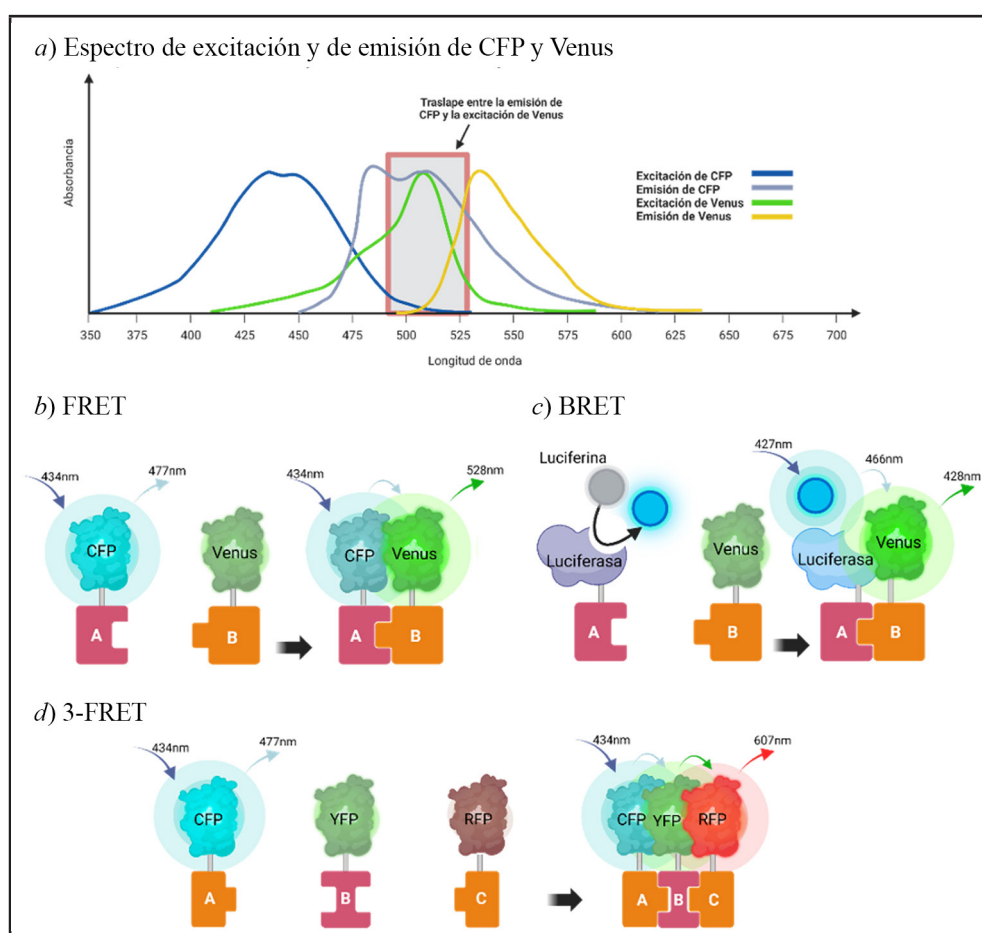


FIGURA 3

Técnicas de transferencia de energía para detección de interacciones diméricas y triméricas

a) Se muestran los espectros de excitación y de emisión de CFP y Venus. Se indica el rango donde la longitud de onda de emisión de CFP se traslapa con la de excitación de Venus (recuadro color rojo). b) En la interacción mediante FRET la proteína A se fusiona a CFP (donador) y la proteína B se fusiona a Venus (aceptor). Si A interacciona con B ambos fluoróforos se acercan y al excitar al donador hay transferencia de energía de CFP a Venus indicando una interacción dimérica. c) En la interacción mediante BRET, la proteína A se fusiona a luciferasa y B a Venus. La luciferasa al hidrolizar luciferina emite señal a una longitud de onda similar a la que necesita Venus para excitarse. Si A interacciona con B, hay transferencia de energía de la luminiscencia generada por la luciferasa hacia Venus. d) En 3-FRET, A, B y C se fusionan a CFP, YFP y RFP respectivamente. Si hay interacción trimérica, al excitar CFP habrá transferencia de energía a YFP y de YFP a RFP.

Fuente: elaboración propia en BioRender.com.

Al igual que BiFC, FRET también ha sido adaptado tanto con distintos pares de proteínas fluorescentes como con el uso de tres fluoróforos que permiten la detección de una interacción trimérica en una técnica llamada *3-FRET* (figura 3d). En esta técnica si una proteína de fusión interacciona con otra, hay transferencia de energía y la emisión de esta segunda proteína fluorescente excita a la tercera si se aproximan lo suficiente (Strotmann *et al.*, 2022). Esta estrategia se ha empleado para determinar la formación de complejos triméricos formados por receptores de la membrana plasmática (Lopez-Gimenez *et al.*, 2007), la formación de un complejo trimérico formado por las proteínas BRI1, BAK1 y RLP44 implicadas en la vía de transducción de señal de la hormona brassinosteroide (Glöckner *et al.*, 2022) y en la detección de agregados proteicos involucrados en diversas patologías humanas (Tarabara *et al.*, 2021).

5. DETECCIÓN DE INTERACCIONES MULTIMÉRICAS

Para la detección de interacciones multiméricas, además de las técnicas triméricas mencionadas, se ha propuesto la combinación de técnicas de complementación con las de transferencia de energía. Se ha comprobado que la luciferasa, al hidrolizar la luciferina, genera bioluminiscencia que puede servir como donador para Venus, además de evidenciar la formación de un complejo trimérico mediante la técnica denominada *BiFC-BRET* (figura 4a). Con esta técnica se han logrado detectar interacciones triméricas entre proteínas G y proteínas efectoras, entre RAMP1 y un homodímero del receptor CRLR, entre tres receptores de adenosina A2A, así como el ensamblaje de receptores funcionales de orden superior (Rebois *et al.*, 2006; Héroux *et al.*, 2007; Gandia *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2021).

Con esta misma lógica, también se ha realizado la combinación de BiFC y FRET con la fluorescencia de CFP unida a una proteína de interés que actúa como donador excitando a Venus reconstituido por BiFC, que actúa como aceptor. Esta técnica, conocida como *FRET basado en BiFC* (BiFC-based FRET) o BiFC-FRET fue propuesta por primera vez en 2008 y probada con los factores de transcripción Jun, Fos y p65 (Shyu *et al.*, 2008). BiFC-FRET se fundamenta en la transferencia de energía entre fluoróforos, es decir, la transferencia de energía de CFP a Venus reconstituido, que indica la formación de un complejo trimérico (figura 4b).

La combinación de las tecnologías BiFC y FRET ha probado ser una buena estrategia para el análisis de interacciones triméricas debido a que no requiere de sustratos externos. Su factibilidad se corroboró mediante el análisis de la formación de complejos triméricos del receptor de adenosina A2A previamente descritos mediante BiFC-BRET (Vidi *et al.*, 2008). BiFC-FRET también se ha adaptado como un método de tamizaje para el descubrimiento y evaluación de drogas contra el Virus de la Influenza A (IAV), puesto que con esta técnica es posible verificar si un fármaco inhibe la formación del trimero necesario para la replicación viral (Dai *et al.*, 2012). Además, se ha utilizado en el análisis de la interacción de proteínas involucradas con la regulación de los ciclos circadianos (Lee *et al.*, 2015). También, en neurociencias se ha analizado la formación de complejos proteicos en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Wang y Pei, 2018). Más recientemente, se ha empleado para el estudio de complejos triméricos formados por factores de transcripción MADS-box y una proteína sensor de calcio (Boora *et al.*, 2021). En nuestro laboratorio, hemos implementado la combinación de estas estrategias para determinar la formación de interacciones triméricas entre factores de transcripción basales como TBP, TFIIE β y BIP2 con la homeoproteína Antennapedia y el cofactor Extradenticle, así como su efecto en un nivel transcripcional (Jiménez-Mejía *et al.*, 2022).

Además del estudio de las interacciones triméricas, también se ha adaptado la combinación de dos BiFC simultáneos con dos proteínas fluorescentes (GFP y RFP). Al complementarse ambas proteínas, el traslape en sus espectros de emisión y excitación permite la transferencia de energía mediante FRET evidenciando la interacción tetramérica (figura 4c) (Cevheroglu *et al.*, 2021).

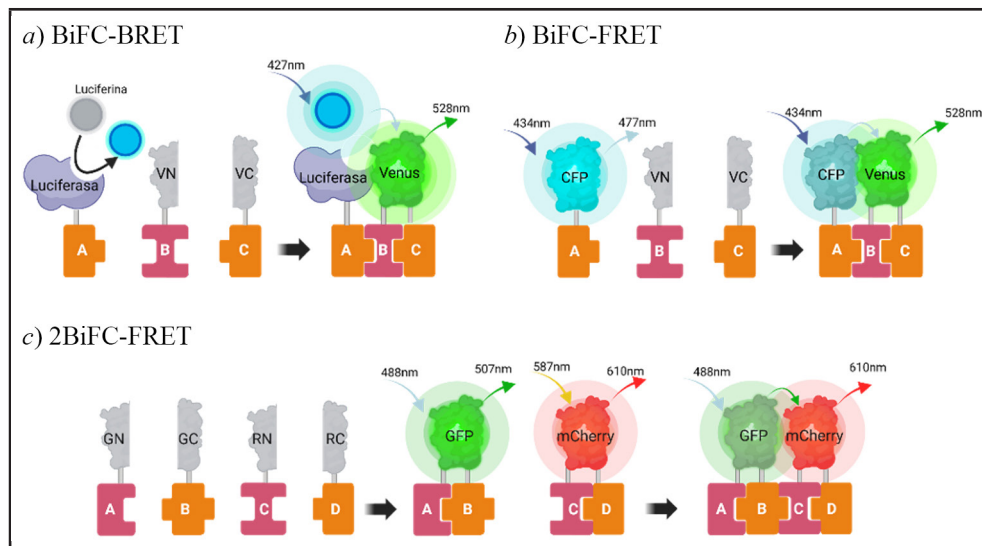


FIGURA 4

Técnicas de complementación y transferencia de energía para detección de interacciones multiméricas

a) En BiFC-BRET la proteína A se fusiona a luciferasa y dona energía a Venus que se reconstituye cuando las proteínas B y C interaccionan (BiFC). Si A interacciona con B-C, al hidrolizarse la luciferina habrá transferencia de energía a Venus (BRET) indicando la interacción trimérica. b) En BiFC-FRET, A es fusionada con CFP y Venus se reconstituye por la interacción de B y C (BiFC). Si A interacciona con B-C, habrá transferencia de CFP a Venus (FRET). c) En el 2BiFC-FRET dos proteínas fluorescentes se escinden y cada fragmento se une a una proteína de interés. Si A interacciona con B, se reconstituye GFP; si C interacciona con D, se reconstituye mCherry. Si A-B interaccionan con C-D, hay transferencia de energía entre GFP y mCherry indicando una interacción tetramérica.

Fuente: elaboración propia con base en BioRender.com

PROSPECTIVA

Las estrategias actuales para el análisis de PPIs requieren la adición de etiquetas proteicas como luciferasa, proteínas fluorescentes o sus fragmentos que al aproximarse lo suficiente emiten una señal indicativa de la interacción. En la actualidad, el análisis de las PPIs usando fluorescencia se encuentra orientado hacia el hallazgo de complejos multiproteicos, por lo que las técnicas de complementación bimolecular y transferencia de energía se han ido adaptando y combinado para evidenciar interacciones multiproteicas mediante microscopía (Cevheroglu *et al.*, 2021) o citometría (Lim *et al.*, 2022). Sin embargo, en la medida en que se desee analizar complejos de mayor magnitud se vuelve cada vez más complicado estandarizar la topología de fusión de cada proteína y además estas “etiquetas proteicas” en algunas ocasiones afectan la función de las proteínas o sus interacciones. Dado lo anterior, se han desarrollado otras estrategias novedosas como BioID y APEX que permiten la detección de complejos proteicos más grandes. En estas estrategias se etiqueta una proteína de interés en la célula con una enzima que marca con biotina las proteínas del complejo multiproteico en el que participa, las cuales pueden ser identificadas por espectrometría de masas (Roux *et al.*, 2012; Rhee *et al.*, 2013). Estas estrategias se han utilizado exitosamente para determinar los interactomas del RNA de la telomerasa humana (Han *et al.*, 2020) y el de Zucchini, uno de los factores clave en la biogénesis de piRNAs en el ovario de *Drosophila* (Nguyen *et al.*, 2023). Las estrategias de BioID y APEX se han adaptado como técnicas de complementación molecular, donde si las dos proteínas de interés interaccionan, se logra el etiquetado con biotina en el complejo (Ramirez *et al.*, 2021; Han *et al.*, 2019). Las modificaciones en las técnicas disponibles en este momento junto con la generación de nuevas estrategias permitirán comprender cada vez más los interactomas y su relación con los procesos celulares *in vivo*, así como su papel en distintas patologías para su uso potencial en el diseño de blancos terapéuticos.

CONCLUSIONES Y RESULTADOS

El estudio de las PPIs es de gran relevancia para el entendimiento de una gran cantidad de mecanismos moleculares que rigen todos los procesos celulares, muchos de los cuales están involucrados en el desarrollo de patologías. Las técnicas para la identificación de interacciones proteína-proteína han ido evolucionando para revelar de una forma más fidedigna lo que ocurre dentro de la célula: pasan de estrategias *in vitro* como *pull-down* y Co-IP hasta las técnicas fluorescentes actuales que tienen la ventaja de la detección y visualización de las interacciones y su localización subcelular *in vivo* en tiempo real.

En conclusión, las técnicas de fluorescencia han desplazado las técnicas convencionales que dependen de reacciones enzimáticas, ya que evitan el uso de sustratos adicionales y permiten adaptarse en combinación con otras técnicas para la detección de complejos proteicos más grandes. Las diversas combinaciones de BiFC, BiLC, BRET y FRET permiten la detección *in vivo* de complejos multiproteicos cada vez de mayor magnitud y evidencian que el ingenio no tiene límites para crear nuevos diseños multicolor, por lo que no será sorpresa la generación de propuestas más novedosas, robustas, accesibles y con mayor factibilidad técnica.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero del Conahcyt con número de proyecto CF-2019-2280 y a la M. C. Alejandra Arreola-Triana por su apoyo en la revisión del manuscrito. G. J. M. y R. M. M. agradecen el apoyo de las becas de Conahcyt 722363 y 814714 respectivamente. Asimismo, extendemos un agradecimiento a los árbitros por sus valiosas observaciones al manuscrito.

REFERENCIAS

- Altamirano-Torres, C., Salinas-Hernández, J. E., Cárdenas-Chávez, D. L., Rodríguez-Padilla, C., & Reséndez-Pérez, D. (2018). Transcription factor TFIIE β interacts with two exposed positions in helix 2 of the Antennapedia homeodomain to control homeotic function in *Drosophila*. *PLOS ONE*, 13(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205905>
- Aronheim, A., Zandi, E., Hennemann, H., Elledge, S. J., & Karin, M. (1997). Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions. *Molecular and Cellular Biology*, 17(6), 3094-3102. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.6.3094>
- Bischof, J., Duffraisse, M., Furger, E., Ajuria, L., Giraud, G., Vanderperre, S.,... & Merabet, S. (2018). Generation of a versatile BiFC ORFeome library for analyzing protein-protein interactions in live *Drosophila*. *eLife*, 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.38853>
- Boora, N., Verma, V., Khurana, R., Gawande, G., Bhimrajka, S., Chaprana, K.,... & Kapoor, S. (2021). Determination of Tripartite Interaction between Two Monomers of a MADS-box Transcription Factor and a Calcium Sensor Protein by BiFC-FRET-FLIM Assay. *Journal of Visualized Experiments*, 178. <https://doi.org/10.3791/62791>
- Broder, Y. C., Katz, S., & Aronheim, A. (1998). The ras recruitment system, a novel approach to the study of protein-protein interactions. *Current Biology*, 8(20), 1121-1130. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)70467-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70467-1)
- Broome, A. M., Bhavsar, N., Ramamurthy, G., Newton, G., & Basilion, J. P. (2010). Expanding the utility of β -galactosidase complementation: piece by piece. *Molecular Pharmaceutics*, 7(1), 60-74. <https://doi.org/10.1021/mp900188e>

- Ciruela, F. (2008). Fluorescence-based methods in the study of protein-protein interactions in living cells. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(4), 338-343. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.06.003>
- Cevheroglu, O., Murat, M., Mingu-Akmete, S., & Son, C. D. (2021). Ste2p Under the Microscope: the Investigation of Oligomeric States of a Yeast G Protein-Coupled Receptor. *The Journal of Physical Chemistry B*, 125(33), 9526-9536. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.1c05872>
- Chen, M., Li, W., Zhang, Z. P., Pan, J., Sun, Y., Zhang, X.,... & Cui, Z. (2018). Three-fragment fluorescence complementation for imaging of ternary complexes under physiological conditions. *Analytical Chemistry*, 90(22), 13299-13305. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02661>
- Dai, J.-P., Li, W.-Z., Zhao, X.-F., Wang, G.-F., Yang, J.-C., Zhang, L., Chen, X.-X., Xu, Y.-X., & Li, K.-S. (2012). A Drug Screening Method Based on the Autophagy Pathway and Studies of the Mechanism of Evodiamine against Influenza A Virus. *PLOS ONE*, 7(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042706>
- Ding, H., & Johnson, G. V. (2008). New application of β -galactosidase complementation to monitor tau self-association. *Journal of Neurochemistry*, 106(4), 1545-1551. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05496.x>
- Galarneau, A., Primeau, M., Trudeau, L. E., & Michnick, S. W. (2002). β -Lactamase protein fragment complementation assays as in vivo and in vitro sensors of protein-protein interactions. *Nature Biotechnology*, 20, 619-622. <https://doi.org/10.1038/nbt0602-619>
- Gandia, J., Galino, J., Amaral, O. B., Soriano, A., Lluís, C., Franco, R., & Ciruela, F. (2008). Detection of higher-order G protein-coupled receptor oligomers by a combined BRET-BiFC technique. *FEBS letters*, 582(20), 2979-2984. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.07.045>
- Gao, X., Enten, G. A., DeSantis, A. J., & Majetschak, M. (2021). Class AG protein-coupled receptors assemble into functional higher-order hetero-oligomers. *FEBS letters*, 595(14), 1863-1875. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14135>
- Gehl, C., Kaufholdt, D., Hamisch, D., Bikker, R., Kudla, J., Mendel, R. R., & Hansch, R. (2011). Quantitative analysis of Dynamic protein-protein interactions in planta by a floated-leaf luciferase complementation imaging (FLuCI) assay using binary Gateway vectors. *The Plant Journal*, 67(3), 542-553. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04607.x>
- Glöckner, N., zur Oven-Krockhaus, S., Rohr, L., Wackenhut, F., Burmeister, M., Wanke, F., ... & Harter, K. (2022). Three-fluorophore FRET Enables the Analysis of Ternary Protein Association in Living Plant Cells. *Plants*, 11(19), 2630. <https://doi.org/10.3390/plants11192630>
- Gonzalo, Ó., Benedi, A., Vela, L., Anel, A., Naval, J., & Marzo, I. (2023). Study of the Bcl-2 Interactome by BiFC Reveals Differences in the Activation Mechanism of Bax and Bak. *Cells*, 12(5), 800. <https://doi.org/10.3390/cells12050800>
- Han, Y., Branon, T. C., Martell, J. D., Boassa, D., Shechner, D., Ellisman, M. H., & Ting, A. (2019). Directed Evolution of Split APEX2 Peroxidase. *ACS chemical biology*, 14(4), 619-635. <https://doi.org/10.1021/acschembio.8b00919>
- Han, S., Zhao, B. S., Myers, S. A., Carr, S. A., He, C., & Ting, A. Y. (2020). RNA-protein interaction mapping via MS2-or Cas13-based APEX targeting. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(36), 22068-22079. <https://doi.org/10.1073/pnas.2006617117>
- Hashimoto, T., Adams, K. W., Fan, Z., McLean, P. J., & Hyman, B. T. (2011). Characterization of oligomer formation of amyloid- β peptide using a split-luciferase complementation assay. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(31), 27081-27091. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.257378>

- Héroux, M., Hogue, M., Lemieux, S., & Bouvier, M. (2007). Functional calcitonin gene-related peptide receptors are formed by the asymmetric assembly of a calcitonin receptor-like receptor homo-oligomer and a monomer of receptor activity-modifying protein-1. *Journal of Biological Chemistry*, 282(43), 31610-31620. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701790200>
- Hida, N., Awais, M., Takeuchi, M., Ueno, N., Tashiro, M., Takagi, C.,... & Ozawa, T. (2009). High-sensitivity real-time imaging of dual protein-protein interactions in living subjects using multicolor luciferases. *PLOS ONE*, 4(6) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005868>
- Hohlbein, J., Craggs, T. D., & Cordes, T. (2014). Alternating-laser excitation: single-molecule FRET and beyond. *Chemical Society Reviews*, 43(4), 1156-1171. <https://doi.org/10.1039/C3CS60233H>
- Imani, M., Mohajeri, N., Rastegar, M., & Zarghami, N. (2021). Recent advances in FRET-Based biosensors for biomedical applications. *Analytical biochemistry*, 630, 114323. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114323>
- Johnsson, N., & Varshavsky, A. (1994). Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(22), 10340-10344. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.22.10340>
- Jia, Y., Bleicher, F., Reboulet, J., & Merabet, S. (2021). Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) and Multiplexed Imaging of Protein-protein Interactions in Human Living Cells. *Methods in Molecular Biology*, 2350, 173-190. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1593-5_12
- Jiménez-Mejía, G., Montalvo-Méndez, R., Hernández-Bautista, C., Altamirano-Torres, C., Vázquez, M., Zurita, M., & Reséndez-Pérez, D. (2022). Trimeric complexes of Antp-TBP with TFIIE β or Exd modulate transcriptional activity. *Hereditas*, 159(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s41065-022-00239-8>
- Kerppola, T. K. (2008). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annu. Rev. Biophys.*, 37(1), 465-487. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.37.032807.125842>
- Kobayashi, H., Picard, L. P., Schönege, A. M., & Bouvier, M. (2019). Bioluminescence resonance energy transfer-based imaging of protein-protein interactions in living cells. *Nature Protocols*, 14(4), 1084-1107. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0129-7>
- Lage, K. (2014). Protein-protein interactions and genetic diseases: The interactome. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1842(10), 1971-1980. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.05.028>
- Lang, Y., Li, Z., & Li, H. (2019). Analysis of protein-protein interactions by split luciferase complementation assay. *Current Protocols in Toxicology*, 82(1). <https://doi.org/10.1002/cptx.90>
- Lee, Y., Chun, S. K., & Kim, K. (2015). Sumoylation controls CLOCK-BMAL1-mediated clock resetting via CBP recruitment in nuclear transcriptional foci. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1853(10), 2697-2708. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.07.005>
- Li, C., Wang, Z., Cao, Y., Wang, L., Ji, J., Chen, Z., Deng, T., Jiang, T., Cheng, G., & Qin, F. X. F. (2017). Screening for novel small-molecule inhibitors targeting the assembly of influenza virus polymerase complex by a bimolecular luminescence complementation-based reporter system. *Journal of Virology*, 91(5). <https://doi.org/10.1128/JVI.02282-16>
- Lim, J., Petersen, M., Bunz, M., Simon, C., & Schindler, M. (2022). Flow cytometry based-FRET: basics, novel developments and future perspectives. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79(4), 217. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04232-2>
- Lopez-Gimenez, J. F., Canals, M., Padiani, J. D., & Milligan, G. (2007). The $\alpha 1b$ -adrenoceptor exists as a higher-order oligomer: effective oligomerization is required for receptor maturation, surface delivery, and function. *Molecular Pharmacology*, 71(4), 1015-1029. <https://doi.org/10.1124/mol.106.033035>

- Montalvo-Méndez, R. de J. (2020). Disección molecular de la interacción de TBP con las homeoproteínas Scr, Ubx y AbdB mediante BiFC en la línea celular HEK293 (tesis de maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León. <http://eprints.uanl.mx/id/eprint/21785>
- Nguyen, T. T. M., Munkhzul, C., Kim, J., Kyoung, Y., Vianney, M., Shin, S.,... & Lee, M. (2023). In vivo profiling of the Zucchini proximal proteome in the Drosophila ovary. *Development*, 150(4), dev201220. <https://doi.org/10.1242/dev.201220>
- Parrish, J. R., Gulyas, K. D., & Finley Jr, R. L. (2006). Yeast two-hybrid contributions to interactome mapping. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(4), 387-393. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.06.006>
- Paiano, A., Margiotta, A., De Luca, M., & Bucci, C. (2019). Yeast two-hybrid assay to identify interacting proteins. *Current Protocols in Protein Science*, 95(1), e70. <https://doi.org/10.1002/cpps.70>
- Peter, M. F., Gebhardt, C., Mächtel, R., Muñoz, G. G. M., Glaenger, J., Narducci, A.,... & Hagelueken, G. (2022). Cross-validation of distance measurements in proteins by PELDOR/DEER and single-molecule FRET. *Nature Communications*, 13(4396). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31945-6>
- Ramirez, C. A., Egetemaier, S., & Béthune, J. (2021). Context-pecific and proximity-dependent labeling for the proteomic analysis of spatiotemporally defined protein complexes with Split-BioID. *Methods in Molecular Biology*, 2247, 303-318. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1126-5_17
- Rebois, R. V., Robitaille, M., Galés, C., Dupré, D. J., Baragli, A., Trieu, P., Ethier, N., Bouvier, M., & Hébert, T. E. (2006). Heterotrimeric G proteins form stable complexes with adenylyl cyclase and Kir3. 1 channels in living cells. *Journal of Cell Science*, 119, 2807-2818. <https://doi.org/10.1242/jcs.03021>
- Renna, L., Stefano, G., & Brandizzi, F. (2018). Live cell imaging and confocal microscopy. In *Plant Vacuolar Trafficking. Methods and Protocols* (pp. 117-130). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7856-4_9
- Rhee, H. W., Zou, P., Udeshi, N. D., Martell, J. D., Mootha, V. K., Carr, S. A., & Ting, A. Y. (2013). Proteomic mapping of mitochondria in living cells via spatially restricted enzymatic tagging. *Science*, 339(6125), 1328-1331. <https://doi.org/10.1126/science.1230593>
- Rossi, F., Charlton, C. A., & Blau, H. M. (1997). Monitoring protein-protein interactions in intact eukaryotic cells by β -galactosidase complementation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(16), 8405-8410. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.16.8405>
- Roux, K. J., Kim, D. I., Raida, M., & Burke, B. (2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *Journal of Cell Biology*, 196(6), 801-810. <https://doi.org/10.1083/jcb.201112098>
- Secco, P., D'Agostini, E., Marzari, R., Licciulli, M., Di Niro, R., D'Angelo, S.,... & Sblattero, D. (2009). Antibody library selection by the β -lactamase protein fragment complementation assay. *Protein Engineering, Design & Selection*, 22(3), 149-158. <https://doi.org/10.1093/protein/gzn053>
- Szalai, A. M., Zaza, C., & Stefani, F. D. (2021). Super-resolution FRET measurements. *Nanoscale*, 13(44), 18421-18433. <https://doi.org/10.1039/D1NR05769C>
- Shyu, Y. J., Suarez, C. D., & Hu, C. D. (2008). Visualization of ternary complexes in living cells by using a BiFC-based FRET assay. *Nature Protocols*, 3, 1693-1702. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.157>
- Strotmann, V. I., & Stahl, Y. (2022). Visualization of *in vivo* protein-protein interactions in plants. *Journal of Experimental Botany*, 73(12), 3866-3880. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac139>
- Tarabara, U., Kirilova, E., Kirilov, G., Vus, K., Zhytniakivska, O., Trusova, V., & Gorbenko, G. (2021). Benzanthrone dyes as mediators of cascade energy transfer in insulin amyloid fibrils. *Journal of Molecular Liquids*, 324(15), 115102. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.115102>

- Thaminy, S., Miller, J., & Stagljar, I. (2004). The split-ubiquitin membrane-based yeast two-hybrid system. *Methods in Molecular Biology*, 261, 297-312. <https://doi.org/10.1385/1-59259-762-9:297>
- Verhoef, L. G., & Wade, M. (2017). Visualization of protein interactions in living cells using bimolecular luminescence complementation (BiLC). *Current Protocols in Protein Science*, 90(1), 30.5.1-30.5.14. <https://doi.org/10.1002/cpps.42>
- Verma, V., Joshi, G., Gupta, A., & Chaudhary, V. K. (2020). An efficient ORF selection system for DNA fragment libraries based on split beta-lactamase complementation. *PLOS ONE*, 15(7), e0235853. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235853>
- Vidi, P. A., Chen, J., Irudayaraj, J. M., & Watts, V. J. (2008). Adenosine A2A receptors assemble into higher-order oligomers at the plasma membrane. *Febs Letters*, 582(29), 3985-3990. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.09.062>
- Wang, T., Yang, N., Liang, C., Xu, H., An, Y., Xiao, S., Zheng, M., Liu, L., Wang, G., & Nie, L. (2020). Detecting protein-protein interaction based on protein fragment complementation assay. *Current Protein and Peptide Science*, 21(6), 598-610. <https://doi.org/10.2174/1389203721666200213102829>
- Wang, X., & Pei, G. (2018). Visualization of Alzheimer's disease related α -/ β -/ γ -secretase ternary complex by bimolecular fluorescence complementation-based fluorescence resonance energy transfer. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 431. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00431>
- Wehrman, T., Kleaveland, B., Her, J. H., Balint, R. F., & Blau, H. M. (2002). Protein-protein interactions monitored in mammalian cells via complementation of β -lactamase enzyme fragments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(6), 3469-3474. <https://doi.org/10.1073/pnas.062043699>
- Yang, Z., Wang, H., Wang, Y., Ren, Y., & Wei, D. (2018). Manufacturing multienzymatic complex reactors in vivo by self-assembly to improve the biosynthesis of itaconic acid in *Escherichia coli*. *ACS Synthetic Biology*, 7(5), 1244-1250. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00086>

CC BY-NC-ND