Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální biologicko-chemické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů

Jana Křivková

Moderní metody studia protein-proteinových interakcí

Current methods in protein-protein interactions research

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Ivan Hrdý, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 4. 8. 2022 Jana Křivková

Ráda bych poděkovala svému školiteli Doc. RNDr. Ivanu Hrdému, Ph.D., který mi i přes časový pres byl ochotný poskytnout konzultaci a cenné rady. Taktéž děkuji svým přátelům zejména za psychickou podporu.

Abstrakt

Protein-proteinové interakce (PPI) hrají nepostradatelnou roli ve všech procesech v živých buňkách. Pochopení interakcí mezi proteiny nám umožňuje bližší popis buněčných dějů a jejich pochopení otevírá nové možnosti i pro návrh léčiv. Důležitost otázky studia PPI se odráží v recentním rozvoji různorodých metod pro jejich identifikaci a popis.

Cílem této práce je sumarizovat poznatky o nových a zdokonalených experimentálních metodách identifikace a charakterizace proteinových interakcí. Metody popsané v této práci jsou členěny do čtyř kapitol, metody blízkostí indukovaného značení proteinů (BioID, BioID2, APEX, TurboID, MiniTurbo, PUP–IT, AirID, SPPLAT, EMARS), využití síťování proteinů pro jejich identifikaci a strukturní charakterizaci (XL–MS), fluorescenční metody identifikace a vizualizace (BiFC, FRET, BRET) a biofyzikální metody pro stanovení kinetických či termodynamických parametrů interakce (SPR, ITC, MT).

Klíčová slova

proximitní značení, BioID, TurboID, FRET, povrchová plasmonová resonance, protein-proteinové interakce, síťování proteinů

Abstract

Protein-protein interactions (PPI) have a crucial role in all processes in living cells. Understanding the interactions between proteins allows us to describe cell processes in more detail and their study opens new possibilities for drug design. The importance of the question of studying PPI is shown in the recent development of various methods for their identification and description.

The aim of this thesis is to give an overview of new and improved experimental methods of identification and characterization of protein-protein interactions. Methods described in this thesis are divided in four chapters – proximity–dependent labelling methods (BioID, BioID2, APEX, TurboID, MiniTurbo, PUP–IT, AirID, SPPLAT, EMARS), cross–linking methods (XS–MS), fluorescence methods for identification and visualization (BiFC, FRET, BRET) and biophysical methods for description of kinetics and thermodynamics parameters of interaction (SPR, ITC, MT).

Keywords

proximity labeling, BioID, TurboID, FRET, surface plasmon resonance, protein-protein interactions, protein cross-linking

Obsah

1 Úvod **1**

2 Blízkostí indukované značení proteinů **2**

2.1 Metody využívající biotin ligázy 3

2.1.1 BioID a BioID2 3

2.1.2 TurboID a MiniTurbo 5

2.2 Metody využívající askorbát peroxidázu 6

2.2.1 APEX a APEX2 7

2.3 Metody využívající křenovou peroxidázu 7

2.3.1 EMARS a SPPLAT 8

2.4 PUP-IT 8

3 Síťování proteinů **10**

3.1 Chemické síťování proteinů 10

3.2 Fotosíťování proteinů 10

3.3 Inkorporace nepřirozených aminokyselin 11

4 Metody s využitím fluorescence **14**

4.1 BiFC 14

4.2 FRET 15

4.3 BRET 17

5 Biofyzikální metody **18**

5.1 Povrchová plasmonová resonance 18

5.2 Isotermální titrační kalorimetrie 19

5.3 MicroScale termoforéza 20

6 Závěr **22**

Seznam použité literatury **23**

1. Úvod

Protein-proteinové interakce (PPI) jsou zásadní pro všechny děje v živé buňce. Jejich studium nám může poskytnout důležitá data pro pochopení buněčných drah, jejich anomáliích a možnostech léčby. Neustále se vyvíjejí a zdokonalují nové experimentální metody pro zachycení nových interagujících proteinů, jejich izolaci a analýzu meziproteinových interakcí.

Protein-protein interakce jsou zprostředkovány pomocí nekovalentních vazeb. Uplatňují se např. Van der Waalsovy síly (díky stálých nebo indukovaných dipolovým interakcím), elektrostatické interakce (vodíkové můstky, interakce iontů) a hydrofóbní interakce. Vazba nekovalentní je oproti vazbám kovalentní slabší. Většina proteinů má širokou řadu možných interakčních partnerů, společně tvoří tzv. interaktom (proteinová síť, souhrn všech interagujících proteinů). Prvotně lze rozdělit PPI na obligátní a neobligátní. Proteiny, které jsou schopny existovat i ve formě protomeru bez PPI, označujeme jako obligátní naopak pokud je protein bez vytvoření komplexu velmi nestálý, lze jeho interakci považovat za obligátní (Nooren and Thornton, 2003). Podle samotné stálosti jednotlivých interakcí, lze rozdělit PPI na transientní, které charakterizuje doba interakce v řádu sekund a mají relativně vysokou disociační konstantu, a na permanentní (Perkins et al., 2010).

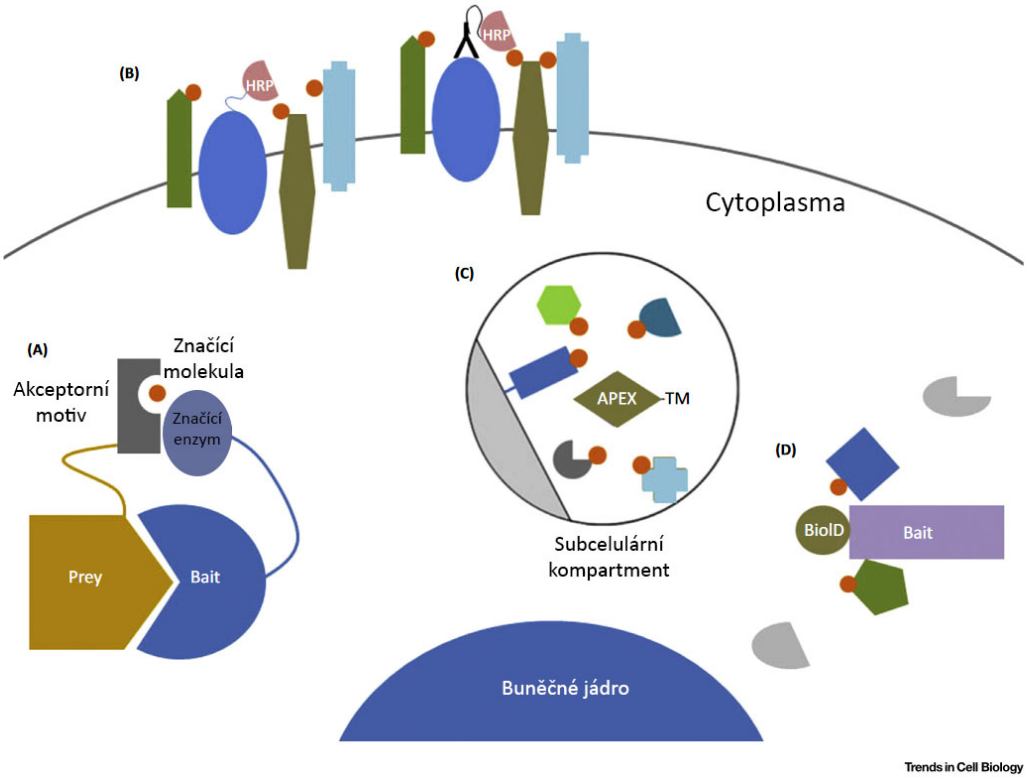
Tato bakalářská práce si klade za cíl podat přehled vybraných moderních metod pro studium PPI s důrazem na možnost *in vivo* aplikace. Do práce jsou vybrány zejména metody, které se v posledních letech zdokonalily a otevírají nové možnosti ve výzkumu PPI. V první části je věnována objevu nových interagujících proteinů pomocí enzymatického značení. V dalších kapitolách potvrzení PPI a vizualizaci pomocí fluorescence, kovalentního provázání díky zesíťování vhodné pro další analýzu zejména hmotnostní spektroskopií. V poslední části jsou představeny metody instrumentální pro kinetický a termodynamický popis interakcí.

Mezi déle používané „konvenční metody“ lze řadit např. kvasinkový dvouhybridový systém (Y2H), afinitní purifikaci či metodu ko-imunoprecipitace. Omezením těchto metod je omezená schopnost identifikovat slabé a transientní interakce, taktéž nelze tyto metody použít pro studium membránových a nerozpustných proteinů (Snider et al., 2015),(Bushell et al., 2008).

Rozvoj studia PPI přispěl i k možnosti využití bioinformatických a genomických metod pro predikci předpokládaných PPI na základě experimentálních dat z interakcí strukturně podobných proteinů. Lze jmenovat tři největší databáze (Snider et al., 2015) s více než 14 000 lidských PPI: IID (Kotlyar et al., 2015), I2D (Brown and Jurisica, 2005) a BioGRID (Chatr-aryamontri et al., 2016).

2. Blízkostí indukované značení proteinů

Během posledních let se do popředí metod studia PPI dostávají metody založené na značení prostorově blízkých proteinů. Tyto metody využívají enzymy, které jsou schopny generovat reaktivní sloučeniny, které difundují v okolí proteinu zájmu a navazují se na možné interakční partnery (Obr. 2.1). Enzymy bývají fúzovány přímo na protein zájmu (protein, jehož PPI chceme zkoumat) a po dodání potřebných reaktantů dochází v určité vzdálenosti ke kovalentnímu navázání na proteiny, tzv. přidání značky (nejčastěji je využíván k navázání biotinu). Označené proteiny mohou být následně izolovány a identifikovány, nejčastěji hmotnostní spektroskopií.



Obr. 2.1: (A) Využití fúze značícího enzymu nebo akceptorového motivu k „bait“ proteinu (v tomto případě se jedná o fúzi značícího enzymu) k navázání značící molekuly k proteinu zájmu „prey“ protein. (B) Využití křenové peroxidázy (HRP) k značení proteinů na povrchu buněk. (C) Využití fúze APEX s „target“ motivem (TM) k mapování proteinů v subcelulárních kompartmentech. (D) Využití metody BioID. Převzato a upraveno (Kim and Roux, 2016)

Podle chemické charakteristiky značícího enzymu lze rozdělit metody blízkostí indukovaného značení (proximity labeling) do několika skupin: metody využívající biotin protein ligázy (např. systém BirA/BAP, BioID, SUMO, TurboID, MiniTurbo), mutované askorbát peroxidázy (APEX, APEX2) a

křenové peroxidázy (EMARS, SPPLAT) a další využívající např. pupylaci pro značení proteinu zájmu.

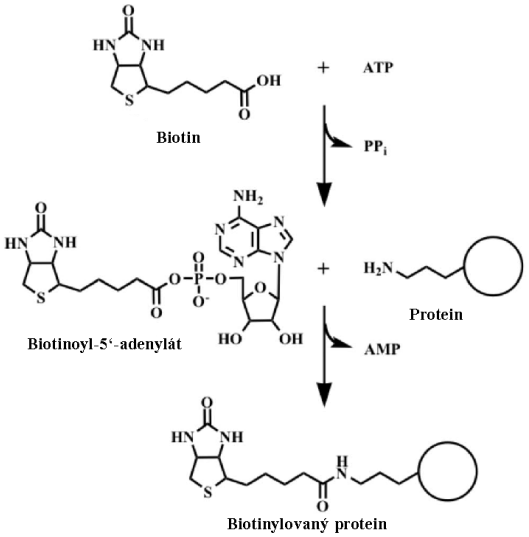
2.1 Metody využívající biotin ligázy

Biotinylace je reakce, při níž je biotin kovalentně připojen k reagující molekule. Ve vodě rozpustný biotin patří do skupiny vitaminu B, bývá nazýván taktéž vitamin B7, H nebo koenzym R. Biotinylace je podstatnou součástí biochemických drah, biotin se zapojuje v metabolismu jako koenzym karboxyláz (Knowles, 1989) a taktéž se biotinylace podílí na regulaci genové exprese, v buněčné signalizaci a organizaci chromatinu (Zempleni, 2005). Biotin je jednou z nejvíce používaných molekul pro značení proteinů, díky možnost snadné detekce a purifikace. Pro rychlou a specifickou izolaci biotinylovaných proteinů je využíváno tvorby stabilního komplexu s glykoproteinem avidinem nebo jeho homology (bakteriální homolog streptavidin nebo NeurAvidin), díky jejich vysoké specificitě a silné vazbě k biotinu – disociační konstanta komplexu avidin-biotin je 1.3·10-15 M (Green, 1975).

2.1.1 BioID a BioID2

Metody BioID (proximity-dependent biotin identification) a BioID2 využívají promiskuitní mutovanou biotin protein ligázu (BPL) k identifikaci PPI a blízkých proteinů in vivo. BioID je založeno na mutované BirA, 35.3 kDa velké biotin ligase z Escherichia coli. Wild-type BirA specificky biotinyluje pouze lysinový zbytek na BCCP (biotin carboxyl carrier protein) podjednotku acetyl-CoA karboxylázy, BirA má nejen enzymatickou aktivitu, ale působí i jako transkripční represor biotinového operonu (Chakravartty and Cronan, 2012). Biotinylace, katalyzované BPL, se skládají ze dvou dílčích reakcích (Obr. 2.2). V první reakci vzniká z ATP a biotinu biotinoyl-AMP (bio-5'-AMP, biotinyl adenylát) za současného uvolnění pyrofosfátu. Bio-5'-AMP zůstává v aktivním místě BPL. V navazující dílčí reakci dochází k nukleofilnímu ataku 6-amino skupiny lysinu z cílového proteinu na anhydridovou skupinu bio-5'-AMP za vzniku peptidové vazby a současného odštěpení AMP (Chapman-Smith and Cronan, 1999).

Wild-type BirA je základem metody BirA/BAP. BirA rozpoznává sekvenci pro biotinylaci, BAP (biotin acceptor peptide), BAP je fúzovaná na protein zájmu a značící enzym BirA je fúzován na prey protein (Beckett et al., 1999; De Boer et al., 2003). Pokud dojde ke kontaktu, či dostatečnému přiblížení těchto dvou proteinů, dojde k biotinylaci. Vzhledem k vysoké substrátové specificitě nejsou biotinylovány proteiny bez BAP, ale je to taktéž limitující pro další využití při identifikaci potenciálních PPI. Výhodou pro zjišťování blízkých proteinů by byla promiskuitní varianta BPL. BirA s mutací R118G (dále označovaná BirA* uvolňuje bio-5'-AMP z aktivního místa Choi-rhee2004. Bio-5'-AMP je nesymetrický anhydrid schopný fungovat jako nespecifické biotinylační činidlo. Nestabilita bio-5'-AMP zajišťuje biotinylaci pouze blízkých proteinů, protože bio-5'-AMP podléhá snadno hydrolýze Cronan2005. BirA* nevykazuje schopnost vázat se na DNA (Kwon et al., 2000).



Obr. 2.2: Mechanismus navázání biotinu katalyzovaný biotin protein ligázou - BirA. Převzato (Henke and Cronan, 2014).

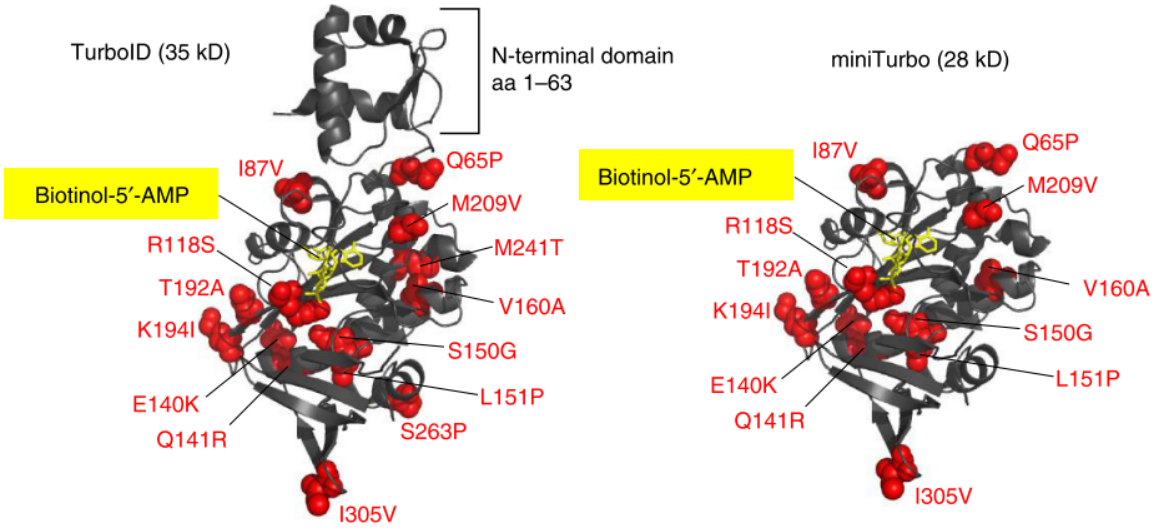
Metoda BioID (proximity-dependent biotin identification), založená na fúzi BirA* k proteinu zájmu, byla poprvé použita k in vivo identifikaci interaktomu intermembránového proteinu laminu A v HeLa buňkách. Buňky byly po expresi BirA* fúzované k laminu A inkubovány v médiu obohaceném biotinem po dobu 24 hodin. Následně byly označené proteiny purifikovány pomocí mikročástic potažených streptavidinem a identifikovány hmotnostní spektrometrií, analýza prokázala schopnost BirA* efektivně *in vivo* značit blízké proteiny i u membránově vázaných proteinů Roux2012. Radius značení pomocí BioID byl stanoven přibližně 10 nm (Kim et al., 2014). BioID se rychle stala široce používanou metodou k identifikace PPI, přispěla nejen ke studiu jaderné membrány, taktéž k studiu mezibuněčných spojů (Van Itallie and Anderson, 2013), signálních drah – Hippo signální dráhy (Oudhoff et al., 2013). BioID bylo zapojeno taktéž do výzkumu rakoviny – proteinu c-MYC uplatňující se v iniciaci a progresi nádoru (Dingar et al., 2015) a mechanismu vztahů mezi patogenem a hostitelem – např. k analýze PPI HIV Gag 1 proteinu (Le Sage et al., 2015; Ritchie et al., 2015), interakci glykoproteinů potřebných ke vstupu herpes virů (Lajko et al., 2015), eukaryotickou signální sekvenci pro inkluzi chlamydií (Kabeiseman et al., 2014), cytoskeletu *Trypanosoma brucei* morriswood2013novel či identifikaci proteinů vnitřní membrány *Toxoplasma gondii* (Chen et al., 2015). BioID byla upravena a optimalizována pro použití in planta v rýži (Lin et al., 2017), v *Arabidopsis thaliana* (Khan et al., 2018) a dalších.

V roce 2016 byla publikována nová zdokonalená metoda BioID2 využívající biotin protein ligázu z termofilního *Aquifex aeolicus*. Autoři se snažili najít menší biotin protein ligázu, která by umožnila účinnější cílení fúzovaných proteinů. BirA z E. coli nebylo možné dále zkracovat kvůli ztrátě katalytických schopností. Biotin ligáza z *A. aeolicus* je nejmenší známou biotin ligázou (233 aminokyselin) a neobsahuje DNA vazebnou doménu. Tato biotin ligáza byla dále optimalizována pro použití v savčích buňkách a do aktivního místa byla zanesena mutace (R40G) pro získání možnosti promiskuitní biotinylace. Optimální teplota pro funkci BioID2 je 50 °C, ale je vysoce efektivní i při 37 °C. Při srovnání BioID a BioID2 byla prokázána minimálně stejná efektivita proximitního značení, ale současně i nutnost nižšího množství biotinu pro biotinylaci v případě BioID2, což usnadňuje značení v modelech s obtížnějším navozením potřebné koncentrace biotinu. Taktéž byla snížena prostorová limitace mezi

proteinem zájmu a fúzovanou biotin ligázou (Kim and Roux, 2016).

2.1.2 TurboID a MiniTurbo

Řízenou evolucí BirA v kvasinkách byly získány dva mutované enzymy – TurboID, 15 mutaci oprotí WT-BirA, a MiniTurbo, s deletovaným N-terminální doménou a 13 mutacemi (Obr. 2.3). Tyto nové varianty enzymu BirA překonávají jednu z největších nevýhod BioID, pomalou enzymovou kinetiku, tudíž dlouhou potřebnou dobu pro úspěšnou biotinylaci (ve většině případu je potřebných 18-24 hodin). Při prvotním testování aktivity těchto enzymů v savčích buňkách (HEK 293T) potvrdily zkrácení potřebné doby pro značení, již po 10 minutách bylo možné dostatečně detekovat označené proteiny. Aktivita TurboID je přibližně dvakrát vyšší než MiniTurbo, to je však kompenzováno menší velikostí (28 kDa MiniTurbo vs 35 kDa TurboID) a nižší afinitou k biotinu poskytující vyšší kontrolu nad dobou značení v přítomnosti vyšších koncentrací endogenního biotinu (Branon et al., 2018).



Obr. 2.3: Struktura TurboID a miniTurbo s červeně znázorněnými mutovanými místy oproti WT-BirA. Žlutě znázorněn navázaný biotin-5'-adenylát. V případě miniTurbo je navíc deletována N-terminální doména. Převzato a upraveno (Branon et al., 2018).

V buněčných kompartmentech vlivem rozdílného pH, redox potenciálu a různým koncentracím endogenních adenylátu může být ovlivněna schopnost značení. TurboID a MiniTurbo byly testováno a srovnány při biotinylaci v buněčném jádře, luminu a membráně endoplasmatického retikula a v mitochondriální matrix. Detekovaná biotinylace po 10 minutách značení TurboID byla vyšší než po 18hodinovém značení metodou BioID Branon2018.

Teplotní optimum 30 °C u TurboID a MiniTurbo otevřelo možnost efektivního využití značení i v jiných než savčích modelových organismech. Prvotně bylo experimentálně otestováno využití *in vivo* v (**?**) a *Ceanorhabditis elegans* (Branon et al., 2018). Metoda TurboID byla následně využita k identifikaci proteinových interakcí NLR receptoru (neucleotide-binding leucine-rich repeat receptor) v *Nicotiana benthamiana* (Zhang et al., 2019), v kvasinkách (Larochelle et al., 2019). Dalším experimentální ověření efektivního značení pomocí TurboID i v MiniTurbo v rostlinách bylo poskytnuto na příkladu *N. benthamiana* a *Arabidopsis thaliana*. Součástí experimentu bylo i ověření efektivity biotinylace v závislosti na podmínkách značení – v 22 °C v semenáčcích *A. thaliana* aktivita obou enzymů

byla téměř identická ve srovnání s 30 °C (Mair et al., 2019).

Další rozšíření využití TurboID bylo umožněno vývojem Split-TurboID, rozdělením TurboID do dvou fragmentů mezi 73 a 74 aminokyselinou. Split-TurboID je enzymaticky aktivnější než výše zmíněné Split-BioID metody a zachovává si výhodu krátké doby potřebné pro značení. Tato metoda byla vyvinuta a poprvé použita pro mapování oblastí doteku endoplasmatické a mitochondriální membrány (Cho et al., 2020).

V roce 2020 byl uveden další enzym odvozený od BioID, konkrétně od ancestrální BirA, pod názvem AirID (ancestral BirA for proximity-dependent biotin identification). Při srovnání aktivity AirID v savčích buňkách, vykazuje AirID vyšší aktivitu než BioID a nižší než TurboID. Avšak oproti TurboID je potřeba menší koncentrace biotinu i ATP pro úspěšnou biotinylaci, což je diskutováno jako výhoda při dlouhodobější kultivaci, kdy může TurboID působit cytotoxicky (Kido et al., 2020).

2.2 Metody využívající askorbát peroxidázu

Askorbát peroxidáza (APX) je 27 kDa velká rostlinná intracelulární peroxidáza. Superskupina rostlinných peroxidáz je sekvenčně velmi variabilní a je dále dělena do tří skupin – I peroxidázy s prokaryotickým původem, II peroxidázy hub a III klasické rostlinné sekretorní peroxidázy – přičemž askorbát peroxidáza (APX) je řazena do skupiny I (Welinder, 1992). Nejenom v rostlinných buňkách, ale i u jiných organismech (např. řasách, ale vyskytuje se i u parazitických prvoků – *Trypanosoma cruzi* (Turrens and Boveris, 1980).

APX se zapojuje do drah na odstranění škodlivých reaktivních forem kyslíku, např. spřažením s oxidací a redukcí glutathionu (askorbát glutathionový cyklus). APX katalyzuje přeměnu peroxidu vodíku na vodu za současné oxidace askorbátu na monodehydroaskorbát (MDHA). MDHA může být následně redukován zpětně na askorbát pomocí monodehydroaskorbátdehydrogenasy za současné oxidace koenzymu NAD(P)H (nikotinamidadenindinukleotid či nikotinamidadenindinukleotidfosfát) na NAD(P)+ (oxidovaná forma NAD(P)H). Druhou možnou cestou regenerace MDHA je jeho spontánní dismutace na dehydroaskorbát (DHA). DHA je následně redukován na askorbát enzymem dehydroacetát dehydrogázou, při této reakci je oxidován glutathion na glutathion disulfid. Glutathion disulfid je poté redukován glutathion reduktázou za současné oxidace NAD(P)H.

APX obsahuje v aktivním místě hem (tetrapyrrolový kruh s navázaným trojmocným železem), který je stěžejní pro reakci s peroxidem (Patterson and Poulos, 1995). Mechanismus reakce s H_2O_2 a následné regenerace pomocí askorbátu je znázorněn níže. Označení enzym I je pro formu APX s 2 volnými elektrony, železo v hemu je oxidováno na oxyferryl APX(Fe^{IV+}=O)R$\cdot$, enzym II je formou APX s 1 volným elektronem APX(Fe^{IV+}=O)R, pro srovnání zápis APX v klidovém stavu APX(Fe^{III})R, H_2As je askorbát, $HAs\cdot$ je radikálovou formou askorbátu (monodehydroaskorbát) a As značí dehydroaskorbát (Raven et al., 2004), převzato z (Dabrowska et al., 2007).

$$H_2O_2 + APX \longrightarrow \text{enzym I} + H_2O$$
$$\text{enzym I} + H_2As \longrightarrow \text{enzym II} + HAs\cdot$$
$$\text{enzym II} + H_2As \longrightarrow APX + HAs\cdot + H_2O$$
$$HAs\cdot + HAs\cdot \longrightarrow H_2As + As$$

2.2.1 APEX a APEX2

APEX (engineered ascorbate peroxidase) je geneticky upravená askorbát peroxidáza poprvé vyvinutá pro barvení v elektronové mikroskopii (EM). Byl hledán nový enzym kompenzující nedostatky používané křenové peroxidázy. K proteinu zájmu fúzovaná peroxidáza po přiblížení substrátu, 3,3'-diaminobenzidinu (DAB), katalyzuje H2O2-závislou polymeraci DAB Martell2012. Polymerizovaný DAB zůstává vysrážen na místě reakce a může sloužit po přidání OsO4 jako kontrast pro EM (Chi and Henderson, 1984).

Důvodem volby právě APX je její možné použití ve všech buněčných kompartmentech. Vzhledem ke skutečnosti, že WT–APX z hrachu tvoří homodimer (Patterson and Poulos, 1995), což by mohlo být komplikací pro další použití jako značky (McKinney et al., 2009), byly do struktury WT–APX zaneseny 2 mutace, inspirované monomerní APX z kukuřice, pro preferenci monomerního stavu – K14D a E112K. Taktéž byla zanesena 3. mutace, W41F, pro zvýšení aktivity k substrátu DAB (Martell et al., 2012).

APEX je však taktéž schopna oxidovat deriváty fenolu na fenoxylové radikály. Fenoxylové radikály jsou schopné tvořit kovalentní vazby s elektronově bohatými aminokyselinami (His, Cys, Tyr, Trp) (Bhaskar et al., 2003; Rhee et al., 2013), reagují velmi rychle, zanikají za méně než 1 ms, což omezuje radius rozptylu na méně než 20 nm (Rhee et al., 2013). APEX fúzovaná k proteinu zájmu po aktivaci přidáním H2O2 katalyzuje přeměnu substrátu, biotin-fenolu, na radikál. Biotin-fenoxylový radikál následně reaguje s blízkými proteiny, čímž dojde k přidání kovalentní značky. Proteiny označené biotinem je možné izolovat pomocí mikročástic potažených streptavidinem a dále analyzovat, např. pomocí MS.

Aktivita a citlivost značení pomocí APEX byla vylepšena řízenou evolucí, mutací A134P. Takto mutovaná APEX byla nazvána APEX2. Mutace A134P se nachází ve smyčce přiléhající k hemu i k vazebnému místo pro substrát. APEX2 má lepší teplotní stabilitu, vyšší kinetickou aktivitu a taktéž lepší toleranci k vysokým koncentracím H2O2. Taktéž je potřeba menší množství koncentrace H_2O_2 během značení (Lam et al., 2014). Vylepšená APEX2 mutací C32S poskytuje lepší výsledky při expresi v savčích buňkách bez vlivu na její enzymatickou aktivitu (Huang et al., 2019). Nezávisle na sobě byly vytvořeny i 2 varianty split-APEX2 pro fragmentovou komplementaci (Xue et al., 2017; Han et al., 2019).

2.3 Metody využívající křenovou peroxidázu

Křen *Armoracia rusticana* ve svém kořeni obsahuje několik peroxidáz. Nejhojnějším isoenzymem je křenová peroxidáza C (HRP – horseradish peroxidase) patřící do skupiny sekretorních rostlinných peroxidáz (Welinder, 1992; Veitch, 2004). HRP je složena z 308 aa, hemového kruhu, 8 glykanových postranních zbytků a tvoří 4 disulfidické můstky potřebné pro její peroxidázovou aktivitu (Welinder, 1976). Redukce peroxidu vodíku HRP se substrátem (např. fenoly, indoly, aminy, sulfonáty) probíhá dle reakce níže, kde HA_2 znázorňuje redukovanou formu substrátu a $HA\cdot$ jeho radikál (Veitch, 2004).

$$H_2O_2 + 2\,HA_2 \xrightarrow{HRP} 2\,H_2O + 2\,HA\cdot$$

HRP je vzhledem k přítomnosti disulfidických můstků aktivní pouze v oxidačním prostředí, je tedy vhodná pro použití v extracelulárním prostředí, v lumen endoplasmatického retikula, Golgiho aparátu a v mitochondriích. Možnost studia PPI na povrchu buněk, případně buněčných membrán využívají

metody EMARS a SPPLAT (viz níže).

Membránově vázaná HRP je využívána i jako kontrastní značka pro elektronovou mikroskopii (HRP katalyzuje polymeraci DAB) a pro fluorescenční mikroskopii (Li et al., 2010). Vytvořením split-HRP (sHRP, HRP rozdělena do dvou komplementárních fragmentů) se otevřela nová možnost studia intercelulárních PPI, která byla prakticky ukázána při vizualizaci synapsí mezi neurony (Martell et al., 2016). V roce 2018 byla vytvořena mutovaná HRP nazvaná enhanced HRP (eHRP), která má oproti wild type 100x větší katalytickou aktivitu, prozatím však byla použita pouze jako kontrastní značka pro elektronovou mikroskopii (Cruz-Lopez et al., 2018).

2.3.1 EMARS a SPPLAT

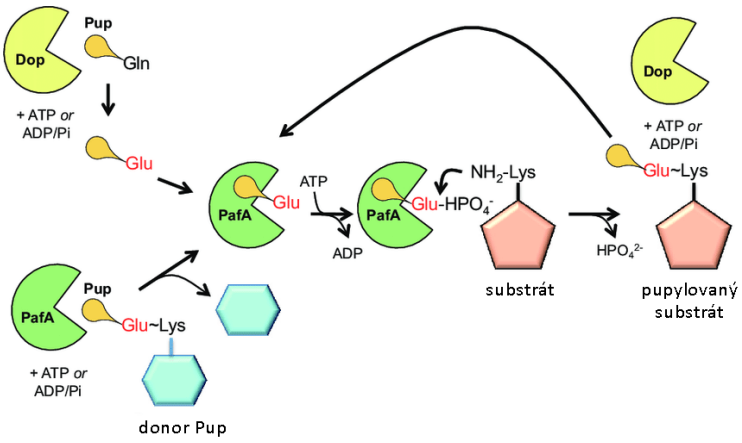
Metoda EMARS (enzyme-mediated activation of radical sources) využívá vzniku radikálů reakcí HRP k identifikaci možných interakcí na povrchu membrán. Prvotní studie využívaly jako reaktant deriváty arylazidu. Nejdříve je k proteinu zájmu navázána protilátka konjugovaná s HRP a následně je přidán derivát arylazidu, který reaguje s HRP za vzniku nitrenového radikálu, který atakuje blízké nukleofilní skupiny. Nitrenový radikál má krátkou dobu života a reaguje s molekulami v okruhu maximálně 200–300 nm od proteinu zájmu (Kotani et al., 2008; Honke and Kotani, 2012).

K usnadnění následné identifikace molekul označených EMARS je využito navázání značek k arylazidu. V prvních experimentech byl využit arylazid s navázaným biotinem, díky možnosti izolace označených molekul navázáním např. na streptavidin. Avšak vzhledem k nespecifické biotinylaci proteinů při průchodu biotinyl-arylazidu přes plasmatickou membránu, byl navržen derivát s navázaným fluoresceinem (Honke and Kotani, 2012). Pro následnou purifikaci je využíváno imunoafinitní chromatografie s protilátkami proti fluoresceinu (Jiang et al., 2012).

SPPLAT (selective proteomic proximity labeling assay using tyramide) je zdokonalením EMARS, kdy je arylazid zaměněn za deriváty obsahující biotinyl-tyramid, který po reakci s HRP za přítomnosti H_2O_2 produkuje fenoxylový radikál (Li et al., 2014). Fenoxylový radikál je schopný efektivnějšího značení a poskytuje menší množství falešně označených molekul (Honke, 2018).

2.4 PUP-IT

PUP-IT (pupylation-based interaction tagging) využívá k značení pupylaci, navázání krátkého proteinu Pup (prokaryotic ubiquitin-like protein) k 6-aminoskupině lysinu za tvorby isopeptidové vazby. Reakce je katalyzována bakteriálním enzymem PafA (proteasome accessory factor A), který označuje pomocí proteinové značky Pup proteiny k degradaci analogicky k ubiquitinu (Iyer et al., 2008; Barandun et al., 2012). Pupylační dráha byla poprvé objevena u *Mycobacterium tuberculosis*, kde se podílí na rezistenci k oxidačnímu a NO stresu při pohlcení bakterie makrofágy (Darwin et al., 2003). Následně byla pupylační dráha potvrzena u dalších zástupců aktinobakterií i jiných kmenů Gramm negativních bakterií DeMot2007. Pup je složen z 60-70 aminokyselin s konzervovaným motivem Gly-Gly-Gln na C konci. V prvním kroku (Obr. 2.4) je C-koncový glutamin deaminován na glutamát (takto deaminovaný Pup bude dále označován jako Pup(E)) pomocí enzymu Dop (deamidase of Pup). Následně v druhém kroku již probíhá tvorba isopeptidové vazby mezi glutamátem Pup(E) a 6-amino skupinou substrátu za katalýzy PafA a ATP jako kofaktoru (Striebel et al., 2009; Sutter et al., 2010).



Obr. 2.4: Pupylace – v prvním kroku Dop (deaminase de Pup) deaminuje de novo syntetizovaný Pup, prokaryotic ubiquitin-like protein (Gln -> Glu, znázorněn na schématu červeně). Následně PafA přenáší fosfátovou skupinu na Glu, což umožní atak 6-aminoskupiny lysinu z blízkého proteinu za tvorby isopeptidové vazby. Enzym PafA (proteasome accessory factor A) je schopný transpupylace, ligace Pup z donorového pupylovaného substrátu na cílový substrát. Depupylace je taktéž katalyzována enzymem Dop. Převzato a upraveno (Zhang et al., 2017).

Prvním ověřením možnosti využití pupylace pro blízkostí indukované značení byla identifikace PPI cytosomálního C konce receptoru CD28 (Liu et al., 2018). Byl využit PafA a Pup z *Corynebacterium glutamicum*. Pro usnadnění další analýzy je možné modifikovat N konec Pup, např. navázáním biotinu, nebo jeho zkrácení z 64 na 28 aminokyselin. V této studii byl hlavně využit Pup(E) fúzovaný s karboxylázovou doménou BCCP, která může být biotinylována endogenními ligázami za vzniku bio-PupE. Bio-pupylované proteiny mohou být dále detekovány western blotem se streptavidinem-HRP, nebo purifikovány na mikročásticích potažených streptavidinem a analyzovány pomocí MS. Vzhledem ke skutečnosti, že Pup(E) neopouští PafA, je označení cílové molekuly závislé na prostorové orientaci mezi PafA a cílovým proteinem. Pro zvýšení flexibility je nutné vložit aminokyselinový linker (20 aminokyselin prodlouží možný dosah o 60–80 Å) (Liu et al., 2018). Byla vyvinuta i kratší varianta značícího peptidu, nazvaná Peptide 4.1, o délce 14 aminokyselin. Peptide 4.1 neobsahuje žádné lysinové zbytky, takže je elimininována možnost navázání více značek na sebe (Sun et al., 2019).

3. Síťování proteinů

Síťování proteinů (anglicky protein cross-linking) je kovalentní propojení dvou či více proteinů. Zesíťované proteiny mohou být následně izolovány (chromatograficky, elektroforeticky, aj.) a nejčastěji analyzovány za použití hmotnostní spektrometrie (cross–linking mass spectrometry, XL–MS) nebo imunologických metod. Stabilizace kovalentním spojením nabízí možnost zachytit i slabé a transientní PPI, navíc MS poskytuje i strukturní informace o proteinových komplexech (Hurst et al., 2004).

Síťování proteinů pomocí chemických činidel je jednou z nejstarších metod pro detekci PPI. Postupným zdokonalováním činidel, viz dále, je možné síťovat proteiny *in vitro* i *in vivo*. Velkým pokrokem je možnost vkládání nekanonických aminokyselin a současně úpravou k jednoduššímu vyhodnocení pomocí MS, čímž se tyto metody zařadily mezi moderní a široce využitelné metody pro studium PPI i interakcí proteinů s nukleovými kyselinami Brunner (1993).

3.1 Chemické síťování proteinů

Proteiny mohou být zesíťovány působením chemických činidel, které reagují s funkčními skupinami proteinu. Nejčastěji jsou využívána činidla heterobifunkční nebo homobifunkční, obsahující ve své struktuře dvě reaktivní místa. Variabilní délka řetězce mezi těmito dvěma aktivními místy může sloužit jako můstek (ang. spacer arm) a optimalizovat vzdálenost propojení (Sinz, 2006).

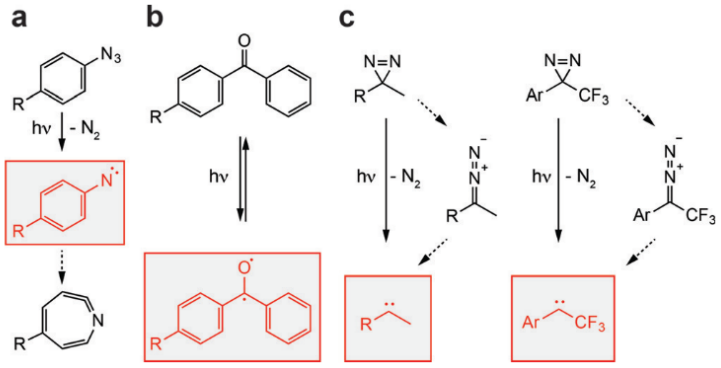
Mezi klasické a dlouhodobě používané činidla patří estery N-hydroxysukcinimidu, imidoestery, karbodiimidy a imidy kyseliny maleinové. Za hlavní nevýhody těchto chemickým činidel, lze považovat částečnou nefunkčnost za fyziologických podmínek a často i špatnou rozpustnost ve vodných roztocích (Sinz, 2006).

Pro použití v živých buňkách je vhodný formaldehyd. Formaldehyd je malá elektrofilní molekula, schopná procházet přes buněčnou stěnou. Formaldehyd primárně atakuje lysinové a tryptofanové zbytky (Sutherland et al., 2008). V prvním kroku reakce se vytváří methylolová skupina, která se následně mění na Schiffovu bázi. Následně Schiffova báze reaguje s dalším nukleofilem a tvorby kovalentní vazby (Hoffman et al., 2015).

3.2 Fotosíťování proteinů

Fotoreaktivní činidla reagují s cílovou molekulou až po ozáření UV světlem. Jakmile dojde k jejich ozáření, vznikají z nich vysoce reaktivní radikály (Obr. 3.1). Tyto radikály rychle nespecificky vytvoří kovalentní vazbu s blízkými molekulami, efektivní radius je v rozsahu několika angstromu (Liu and Schultz, 2010). Arylazidy po ozáření o vlnové délce 250 mm tvoří velmi nestabilní nitrenové radikály.

Nezreagované nitrenové radikály se rychle (asi po 100 mikrosekundách) přeměňují na méně reaktivní na ketiminy. Benzofenoly jsou aktivovány světlem o vlnové délce 350-365 nm a vytváří ketylový diradikál (Dorman and Prestwich, 1994). Diaziriny po ozáření o vlnové délce 360-365 nm vytvářejí karbenový intermediát.



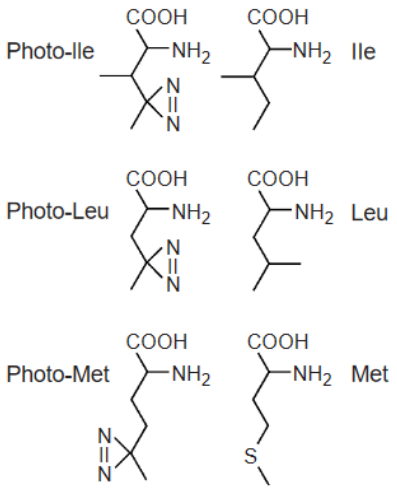
Obr. 3.1: Často používané skupiny činidel pro fotosíťování. A) arylazidy, B) benzofenoly, C) diazirin, převzato (Nguyen et al., 2018).

PIR (protein interaction reporter) je nová skupina činidel pro síťování. Tato činidla obsahují ve své struktuře dvě místa pro rozštěpení při indukci fragmentace MS/MS, po rozštěpení vzniknou dva fragmenty – jeden nesoucí afinitní značku a druhý nesoucí reportér (mass-encoded reporter). Afinitní značka zajistí možnost oddělení afinitní chromatografií a reporter generuje po fragmentaci diagnostický iont (Tang and Bruce, 2010). Byly vytvořeny taktéž činidla s obsaženým radioaktivním isotopem (stable isotope-labeled cross-linkers) pro následné usnadnění vyhodnoceni MS spektra a identifikaci zesíťovaných produktů (Müller et al., 2001).

3.3 Inkorporace nepřirozených aminokyselin

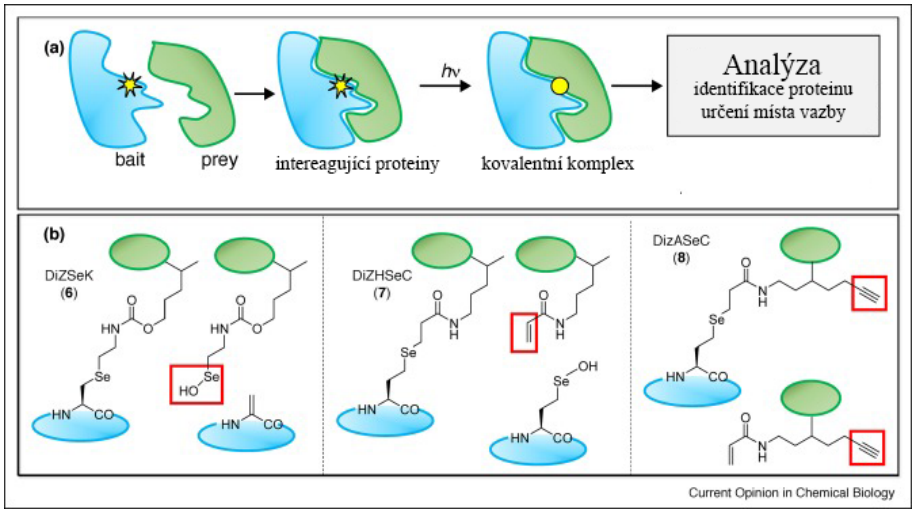
Pokrok v oblasti zabudovávání nepřirozených kyselin do struktury proteinu, otevřelo nové možnosti pro síťování. Uměle vytvořené fotoreaktivní aminokyseliny (FA) odvozené od proteinogenních aminokyselin mohou být zabudované na konkrétní místo v novém peptidovém řetězci a využity pro fotozesíťování. Vytvoření ortogonálních aminoacyl tRNA syntetázy a rozpoznávané umělé aminokyseliny umožnilo inkorporovat fotosíťovací činidlo namísto amber stop kodonu (UAG) (Hino et al., 2005).

Další možností inkorporace FA je metabolická inkorporace. Prvními vytvořenými deriváty se strukturním začleněním diarizinu (Obr. 3.2) byl foto-methionin a foto-leucin. Vzhledem k zachování strukturní podobnosti, jsou tyto FA rozpoznávány a inkorporovány neupravenou translační mašinérií (Suchanek et al., 2005).



Obr. 3.2: Strukturní porovnání přirozených a uměle vytvořených aminokyselin (Suchanek et al., 2005).

Mezi nejčastěji používaná fotočinidla inkorporována do FA patří benzofenony, azidy a diaziriny, a to díky aktivaci světlem o vlnové délce 365 nm, která je vhodná pro *in vivo* aplikace (Hino et al., 2005). Úpravou linkeru lze dosáhnout snadnější MS analýzy (Obr. 3.3). Štěpitelné linkery po přidání oxidačního činidla poskytují možnost selektivního navázání sekundární značky, během rozštěpení jsou od sebe bait a prey protein rozděleny a je možné tedy protein zájmu přednostně analyzovat (Coin, 2018).



Obr. 3.3: a) Znázornění obecného průběhu fotosíťování. Kovalentní zesíťování po ozáření UV světlem a nespecifickém navázání na blízké proteiny je vytvořen kovalentní komplex mezi blízkým proteinem a proteinem zájmu se zabudovanou fotoreaktivní skupinou. B) Využívané typy FA s modifikacemi usnadňující následnou MS analýzu. Po selektivním rozštěpení linkeru obsahují chemické kotvu (znázorněna v červeném rámečku), na kterou je možné selektivně dodat sekundární značku před analýzou. Z leva: **DiZSeK** (N-(3-(3-methyl-3H-diazirin-3-yl)-propaminokarbonyl-L-lysine, **DiZHSeC** (N-(3-(3-methyl-3H-diazirin-3-yl)-propaminokarbonyl-gamma-seleno-L-lysin), Se-(N-(3-(3-methyl-3H-diazirin-3-yl)propyl)propanamide)-3-yl-homoselenocystein), **DizAseC** Se-(N-(3-(3-methyl-3H-diazirin-3-yl)propyl)propanamid)-3-yl-homoselenocystein. Převzato a upraveno (Coin, 2018).

V neposlední řadě dochází k vývoji nepřirozených aminokyselin i pro možnost chemického zesíťování. Tyto aminokyseliny reagují s cílovými funkčními skupinami přirozeně se vyskytujících v proteinech. Upravené aminokyseliny obsahují elektrofilní skupinu, která atakuje nukleofilní skupinu na

postranním řetězci přirozených aminokyselin na proteinu zájmu. Cílovým residuem pro tento nukleofilní atak je často thiolová skupiny cysteinu díky poměrně vysokému nukleofilnímu charakteru. Pro úspěšné provedení zesíťování je nutné, aby elektrofil nespecificky nezreagoval s volnými nukleofily v buňce, ale současně dostatečně reaktivní pro vytvoření kovalentní vazby s proteinem zájmu (Xiang et al., 2013). Byly připraveny varianty aminokyselin obsahující atomy halogenů (např. *p*-2'-fluoroacetylfenyalanin) vykazující schopnost tvorby interproteinových i intra-proteinových vazeb s Cys residui. Tvorba těchto vazeb je ovlivněna vhodnou orientací a blízkostí cílové aminokyseliny, jejím okolím a celkovou reaktivitou halogen-aminokyseliny. Tvorba kovalentní vazby je tedy ovlivněna proximitním efektem, kdy nejdříve dochází k tvorbě nekovalentního komplexu, který sníží aktivační energii a usnadní tedy tvorbu vazby. Interproteinové reakce poskytují trvalé spojení reagujících proteinů a intraproteinové zesíťování může být využito k zvýšení termostability proteinu. (Xiang et al., 2014).

Mimo halogenderiváty aminokyselin jsou využívány i alkyl- a aryl- ketony, trifluoroketony a akrylamidy. Vzhledem ke skutečnosti, že cystein se téměř nevyskytuje na povrchu proteinů a často tvoří sulfidové můstky (Lins et al., 2003), často musí být provedena cílená mutageneze na proteinu zájmu k zaručení úspěšného zesíťování. Alternativu k cysteinové thiolové skupině poskytuje epsilon-amino skupina na lysinu (Baslé et al., 2010). Pro síťovací reakce zacílené na lysin, lze použít deriváty aminokyselin obsahující akrylamidové a sulfonamidové skupiny (Furman et al., 2014).

4. Metody s využitím fluorescence

Do této části jsou zařazeny metody, které k identifikaci PPI využívají fluorescenci. Fluorescence je děj, při kterém látka absorbuje foton, dojde k excitaci – přechodu do vyššího energetického stavu, a následné relaxaci do základního stavu spojenou s emisí fotonu. Vzhledem k možnosti přímé detekce emitujícího záření jsou metody spojené s detekcí fluorescence ideální pro sledování prostorového uspořádání probíhajících dějů a to i v reálném čase. Taktéž je možné provádět experimenty neinvazivně *in vivo* za fyziologických podmínek.

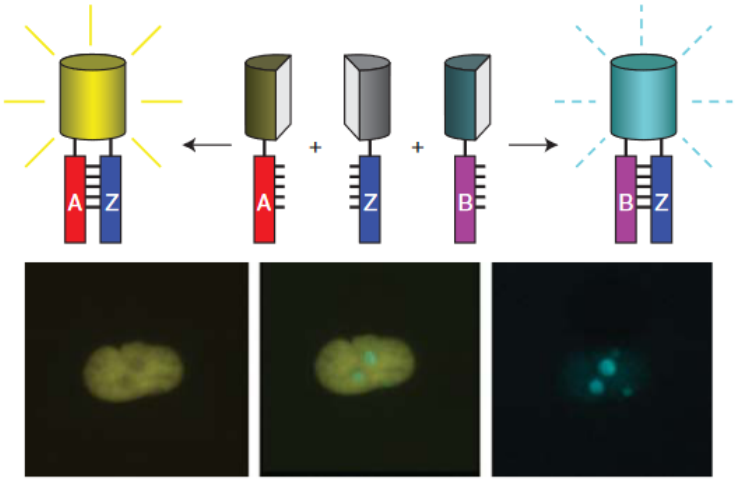
Fluorofory jsou obecně látky schopné absorbovat po ozáření foton a následně jej vyzářit ve formě emisního záření, přičemž emisní záření má delší vlnovou délku než záření absorbované. Látky vykazující fluorescenci mohou být využity jako fluorescenční sondy.

4.1 BiFC

Bimolekulární fluorescenční komplementace (BiFC, bimolecular fluorescence complementation) je metoda založená na vytvoření fluorescenčního komplexu z dvou oddělených fragmentů fluorescenčního proteinu. Dokud nedojde k dostatečnému přiblížení nevykazují tyto fragmenty fluorescenci. Jednotlivý fragment je možné připojit k proteinu zájmu a druhý fragment na hypotetického interakčního partnera. Prvním použitým fluorescenčním proteinem pro BiFC byl GFP (green fluorescent protein) (Ghosh et al., 2000). Následně byly vytvořené fragmenty i YFP (yellow fluorescent protein), které málo fluoreskují, pokud jsou náhodně vázány k neodpovídajícím molekulám a při vazbě na svůj fragment poskytují silnější signál než fragmenty GFP.

Pokud je použito více fragmentů od různých fluorescenčních proteinů, mluvíme o multicolor-BiFC (Obr. 4.1. Multicolor-BiFC umožňuje současně sledovat více interagujících proteinů a jejich vzájemné PPI (Hu and Kerppola, 2003).

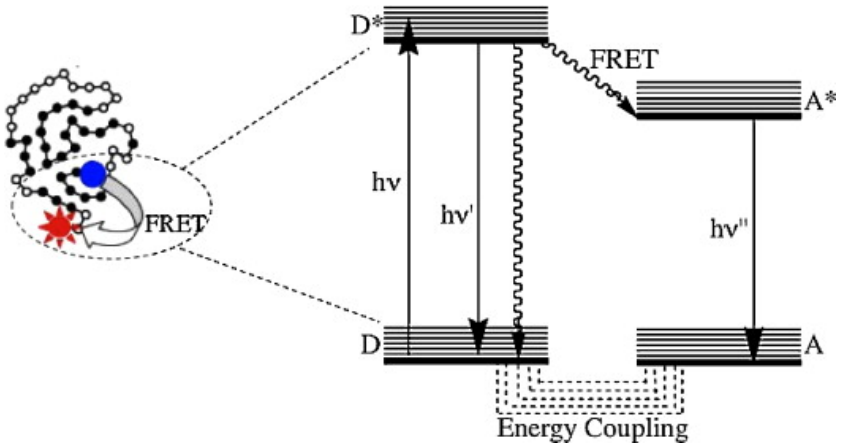
Mezi hlavní limitace použití BiFC v živých buňkách je nutné zmínit zejména vysoké pozadí způsobené buněčnou autofluorescencí a omezení možné velikosti navázaného fragmentu – větší fytochromy mohou mít vliv na funkci a interakce sledovaného proteinu. Pro použití v savčích buňkách je ideální detekce světla v rozmezí 600 – 1300 nm, tedy v oblasti blízkého infračerveného světla (near-infrared). V tomto rozmezí je nízká autofluorescence savčích tkání, malý rozptyl světla a minimální absorbce melaninu, vody a hemoglobinu (Tromberg et al., 2000). Právě menší velikost a idealní fluorescenční spektrum se stalo cílem pro vývoj nových fluorescenčních proteinů pro BiFC. Například protein miRFP670nano, 1,6krát menší než fluorescenční deriváty GFP, byl úspěšně využit pro BiFC k identifikaci interakcí proteinu N nukleokapsidy SARS-CoV-2 (Chen et al., 2022).



Obr. 4.1: Multicolor-BiFC, protein A, B a Z s fúzovanými fragmenty různých fluorescenčních proteinů. Protein Z může interagovat s proteinem A i B, lze tedy sledovat, kde v buňce dochází k interakci a taktéž odhadnout relativní efektivitu tvorby alternativního komplexu. Převzato z (Hu et al., 2017).

4.2 FRET

Försterův resonanční přenos energie (FRET) je fyzikální jev, při němž dochází k přenosu energie molekuly donora (D) na akceptorní (A) molekulu. Prvně byl tento děj popsán již ve 20. letech 20. století, ale mechanismus přenosu byl objasněn v roce 1948 T. Försterem, po němž nese své jméno (Förster, 1948). Principem FRET je nezářivý (tzn. bez uvolnění energie ve formě fotonu) přenos energie díky dipol-dipol interakci (Obr. 4.2).



Obr. 4.2: Schématické znázornění FRET pomocí Jablonského diagramu. D* označuje excitovaný stav molekuly donora, A* excitovaný stav akceptora A, plná čára odpovídá vyzáření energie ve formě fotonu, přerušovaná čára znázorňuje nezářivý přenos. Po excitaci donora (D) dochází k excitaci D*, následně k FRET za současné relaxace D. Excitovaný A* vyzařuje energii ve formě fotonu a relaxuje do nižší energetické hladiny. Základní energetické hladiny D a A jsou energeticky spojeny díky dipol-dipolovým interakcím (znázorněno přerušovanými čarami). Převzato a upraveno z (Sahoo, 2011).

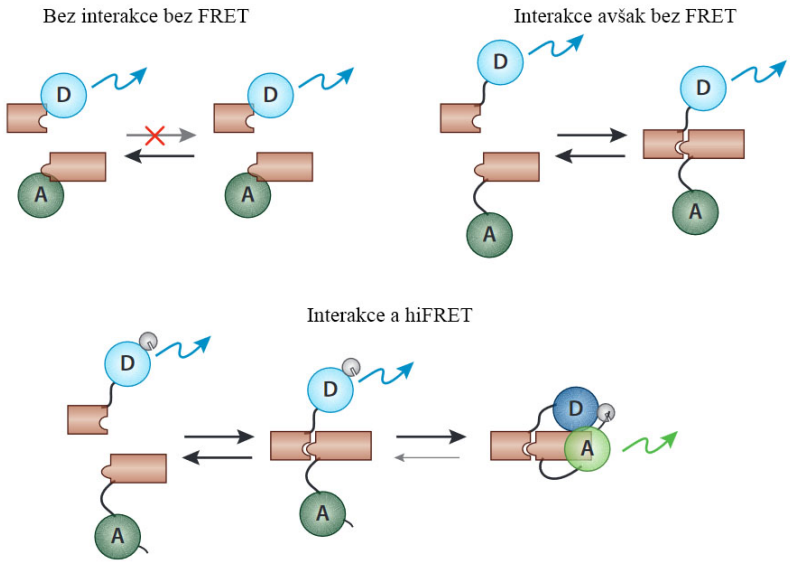
Pro průběh FRET je nutný překryv emisního spektra donora a absorbčního spektra akceptora. Přibližná vzdálenost akceptoru a donoru pro efektivní FRET je 10-100 Å, přičemž efektivita energetického přenosu klesá s šestou mocninou vzdálenosti donora a akceptora. Efektivita FRET je taktéž ovliv-

něna orientací (úhlem) mezi dipóly akceptora a donora (Sahoo, 2011). FRET bývá často označován jako „spektroskopické pravítko“ na základě silné závislosti efektivity na vzdálenosti mezi akceptorem a donorem (Clegg, 1995), (Stryer, 1978).

Pro využití k detekci možných PPI jsou k proteinům zájmu fúzovány s fluorofory schopnými FRET. Pokud nedojde k interakci mezi akceptorem a donorem, pouze fluorofor donora emituje záření. Pokud se donor dostatečně přiblíží k akceptornímu proteinu, po přechodu donorového fluoroforu do excitovaného stavu dochází k FRET a následné emisi fotonu s jinou vlnovou délkou donorovým fluoroforem. FRET je vhodný, jak pro *in vitro* detekci i pro užití *in vivo* díky využití fluorescenčních proteinů (FP), např. CFP (cyan fluorescent protein) a YFP (yellow fluorescence protein), avšak skýtají problém možného sterického omezení proteinů zájmu omezující či zcela zamezující FRET. Další nevýhodou je částečný překryv emisních spekter donorního a akceptorního fluoroforu, což zvyšuje šum pozadí (Berney and Danuser, 2003).

FLIM–FRET (Fluorescence life time imaging–FRET) kombinace FRET s mikroskopií umožňuje s velkou přesností sledovat a lokalizovat PPI v živých buňkách. FLIM-FRET měří rozdíl času, za který dojde k vyhasnutí donora, tj. dobu, za kterou přejde donor z excitovaného stavu do nižší energetické hladiny, v přítomnosti či absenci akceptorního fluoroforu (Gordon et al., 1998). FLIM poskytuje i možnost kvantifikovat PPI v živých buňkách s využitím TCSPC (time–correlated single proton counting). TCSPC detekuje jednotlivé vyzářené fotony, načež je stanovena jejich distribuce. Na základě těchto měření je možné stanovit abundanci interagujících a neinteragujících donorů s akceptory a odhadnout disociační konstantu interagujícího páru (Duncan, 2006).

Optimalizací fluorescenčních sond a přidáním navzájem afinních domén/peptidů na donorový a akceptorní fluorofor byl vytvořen HiFRET (helper–interaction FRET), který je citlivější pro detekci slabších PPI. Přidáním WW či SH3 domény k FP m–Citrinu a odpovídajících afiních peptidů (Gly–Ser, Thr–Gly) dochází k bližšímu přiblížení fluoroforu a uspěšného FRET (Grünberg et al., 2013; Jalink, 2013), schématicky znázorněno (Obr. 4.3).



Obr. 4.3: HiFRET – při fúzi domény s afinitou k odpovídajícího peptidu fúzovaného k fluoroforu pro FRET (fúzované doména/peptid jsou znázorněny šedě), lze dosáhnout vyšší sensibility. Převzato a upraveno (Jalink, 2013).

4.3 BRET

BRET (bioluminiscence resonance energy transfer) je metoda založená na přirozeném FRET u některých mořských živočichů, např. *Aequorea victoria*, *Renilla reniformis* bez nutnosti excitace fluoroforu laserem, ten je nahrazen enzymatickou aktivitou příslušného enzymu (např. luciferázy u *Renilla* (Pfleger and Eidne, 2006). Nejčastěji bývá pro BRET využívána právě luciferáza (Rluc) původem z *Renilla* jako donor a varianta YFP nebo GFP z *Aequorea* jako energetický akceptor. Pro enzymatickou funkci Rluc je potřeba koelenterazinu jako substrátu pro oxidaci za přístupu elementárního kyslíku. Koelenteraziny jsou malé hydrofóbní molekuly se schopní procházet přes membrány (Xu et al., 1999).

V první generaci BRET1 je používán jako substrát benzyl-koelenterazin, v druhé generaci BRET2 je využit bisdeoxykoelenterazin (taktéž označován jako DeepBlueC). V závislosti na použitém substrátu se mění i emisní spektrum Rluc Pfleger and Eidne (2006). Další variantou BRET je eBRET (extended BRET) využívající modifikovaný substrát EduRen pro sledování PPI v delším časovém úseku. eBRET byl úspěšně použit pro sledování interakcí GPCR (G-protein coupled receptor) s beta-arrestinem v průběhu několika hodin (Pfleger et al., 2006).

Výhodami BRET oproti FRET je absence externího zdroje záření, která v případě FRET vede k fototoxicitě a autofluorescenci. Při použití Rluc však je nižší výstupní signál než u FRET. K překonání této limitace byly připraveny upravené luciferázy – mutovaná Rluc8 poskytuje větší přenos energie a tudíž zlepšuje i celkovou citlivost pro detekci (De et al., 2007). Rluc8 spolu s mutovaným červeným fluorescentním proteinem (mOrange) se staly základem pro BRET3, který je vhodný pro sledování PPI v živých organismech vlivem posunutí emisního spektra do červené barvy (De et al., 2009). Dalšího zlepšení bylo dosáhnuto modifikací luciferázy (NanoLuc) z korýše *Oplophorus gracilirostris* a navrhnutím ideálního substrátu furimazinu. NanoLuc poskytuje 150krát lepší aktivitu než jiné využívané luciferázy a je vhodná pro expresi v savčích buňkách (Hall et al., 2012).

5. Biofyzikální metody

Pro bližší pochopení probíhajících interakcí je možné využít metody biofyzikální, díky nimž je možné stanovit kinetické a termodynamické parametry probíhající interakce. Limitace a výhody vybraných metod jsou shrnuty v tabulce 5.1. níže.

Metoda	Výhody	Nevýhody
Povrchová plasmonová resonance	-relativně rychlá -vysoká citlivost -vyžadováno malé množství vzorku -bez nutnosti přidání značky	-nutnost imobilizace vzorku -nelze zkoumat vysoce afinní interakce některé analyty se mohou na povrchu nespecificky vázat-obtížná kvantifikace slabých PPI -velké množství vzorku
Isotermální titrační kalorimetrie	-probíhá v roztoku -bez limitace velikostí molekul -bez nutnosti přidání značky	-časově náročná příprava experimentu -nutnost vysoké rozpustnosti interagujících partnerů -základní požadavek je změna entalpie po navázání interagujícího partnera -nutnost rozpustnosti obou interagujících proteinů ve stejném pufru
MicroScale termoforéza	-rychlá -vyžadovano malé množství vzorku -možnost provést měření i v buněčných lyzátech	-nutnost navázat fluorescenční značku -značka může ovlivnit protein zájmu -photobleaching

Tabulka 5.1: Shrnutí instrumentálních metod, převzato a upraveno (Podobnik et al., 2016)

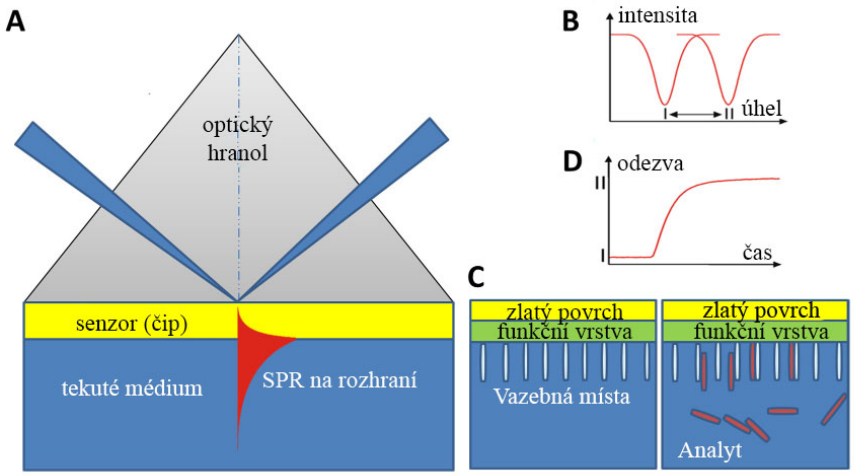
5.1 Povrchová plasmonová resonance

Povrchová plasmonová resonance (surface plasmon resonance, SPR) je jednou z nejpoužívanějších metod pro fyzikální popis PPI mezi dvěmi molekulami. Prostřednictvím SPR experimentu je možné získat data ke stanovení disociační a asociační konstanty, afinitu vazby a termodynamických parametrů interakce. SPR je citlivou metodou, s malými nároky na množství analyzovaného proteinu a není potřeba značení molekul.

Povrchová plasmonová resonance je fyzikální děj v důsledku interakce dopadajícího světla s tenkou vrstvou kovu ve styku s dielektrikem (vodou). Při dopadu světla na rozhraní optického hranolu s vodou dochází podle indexu lomů jednotlivých optických prostředí, úhlu dopadu a rychlosti světla k lomu a odrazu světla. Pokud je dosaženo mezního úhlu, dochází k totálnímu odrazu světla, kdy ne-

prochází vlnění do druhého prostředí. Pokud mezi optický hranol a vodu vložíme slabou vrstvu vodiče (typicky je využívána vrstva zlata), dochází při konkrétním úhlu a frekvenci dopadajícího světla k SPR (Obr. 5.1). Při úplném odrazu světla část záření resonuje s vrstvou kovu a vyvolá excitaci elektronů kovu a jejich pohybu za vzniku tzv. plasmonů (povrchových plasmonových polaritonů) (Gordon and Ernst, 1980). Plasmony vytváří evanescentní elektrické pole s rozsahem 300 nm od styku kovu a testovaného roztoku (Homola et al., 1999). Prvním použitím SPR jako biosenzoru bylo v roce 1983 (Liedberg et al., 1983).

Pro analýzu pomocí SPR je potřeba jednoho z interagujících proteinů (ligand) uchytit na kov (čip). Následně je změřen ideální úhel lomu pro průběh SPR. Vzhledem k závislosti úhlu odrazu na indexu lomu při změně složení média, dochází po přidání a průtoku analytu (druhého interagujícího proteinu) a jejich interakci ke změně ideálního úhlu pro SPR, která je detekována pomocí snížené intenzity odraženého světla. Změna SPR je zaznamenána v resonančních jednotkách (resonance unit, RU), kdy změna o 1000 RU je rovna změně úhlu o 0,1° (Wilson, 2002).



Obr. 5.1: A) Schéma tzv. Kretschmannovy konfigurace, B) spektrum odraženého světla před a po změně indexu lomu, C) navázání analytu na povrch, D) změna indexu lomu způsobená interakcí analytu s ligandem, převzato a upraveno (Nguyen et al., 2015).

Uchycení ligandu na čip může být uskutečněno kovalentním napojením přes amino, hydroxylovou, karboxylovou nebo aldehydickou skupinu. Další možností je uchycení přes protilátky, případě přes GSH fúzní protein, histidinovou nebo biotinovou značku. Tyto vazby však mohou vést k prostorovému omezení proteinu a tím i změně interakce (Khan et al., 2012).

5.2 Isotermální titrační kalorimetrie

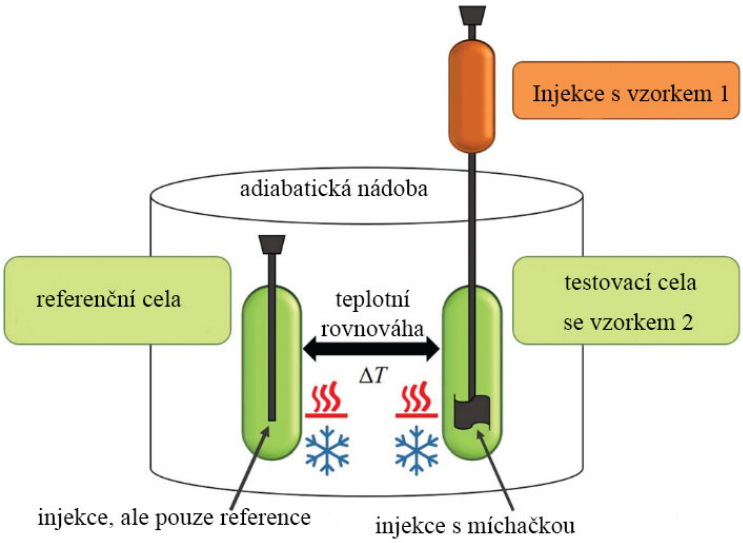
Metoda isotermální titrační kalorimetrie (ITC) poskytuje možnost jediným přímým měřením kvantitativně popsat vazebné a kinetické parametry interagujících proteinů. IST poskytuje možnost stanovit reakční stechiometrii (n), hodnotu disociační konstanty (KD), entropii (ΔS), entalpii (ΔH), teplotní kapacitu (CP), Michaelisovu konstantu (KM) (Freire et al., 1990; Morin and Freire, 1991). Vztah mezi jednotlivými

veličinami je popsán níže.

$$DeltaG = -RTlnK = DeltaH - TDeltaS$$

ITC kalorimetr (Obr. 5.2) se skládá ze dvou kalorimetrických cel z vysoce tepelně vodivých materiálů (např. z Hastelloy slitiny, zlata), v jedné probíhá samotná titrace a je naplněna testovaným vzorkem a v druhé, referenční, je pouze rozpouštědlo shodné s rozpouštědlem použitým pro přípravu vzorku. Obě cely jsou udržovány při stejné teplotě. Roztok s jedním testovaným vzorkem je titrován do vzorkové cely s roztokem druhého interagujícího vzorku. Během titrace je zaznamenávána teplotní změna mezi celami, která je navozena interakcí mezi testovanými vzorky. Pro zaznamenání teplotní změny je využito měření výkonu topného tělesa, které vyrovnává stejnou teplotu mezi celami. Při exotermální reakci je příhřev snížen, naopak při endotermální reakci je příhřev zvýšen (Pierce et al., 1999).

Pro vyhodnocení experimentu je nutné brát v potaz teplotní změnu při rozpuštění titrovaného vzorku v roztoku. Podle typu kalorimetru může probíhat měření této teploty současně v případě dvojinjekčního kalorimetru nebo ve dvou měřeních pokud je možná jen jedna injektáž (Freire et al., 1990). V jednom z měření je místo vzorku v cele použit pouze roztok bez vzorku a titrace tedy probíhá pouze s injektovaným vzorkem, čímž je zaznamenána jeho reakce s rozpouštědlem a standardní měření s použitím obou vzorků.



Obr. 5.2: ITC kalorimetr (Prozeller et al., 2019).

Možnou limitací pro aplikaci metody je nutnost dodržet vhodnou koncentraci vzorků. Parametr c = Kd $\times$ koncentrace dimeru (interagujícího páru) by měl být v rozmezí 1 až 1000 a značí nejmenší a největší měřitelnou hodnotu disociační konstanty. Pro studium vysoce afinních interakcí je optimální koncentrace vzorku velmi nízká a pro nízko afinní naopak velmi vysoká (Wiseman et al., 1989).

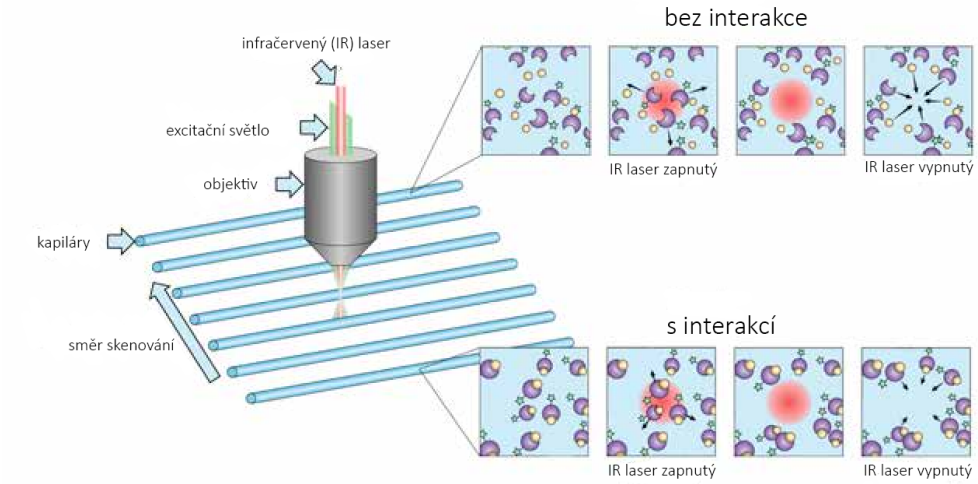
5.3 MicroScale termoforéza

MicroScale termoforéza (MST) je založena na principu termoforézy, což je přímý pohyb molekul po teplotním gradientu (Ludwig, 1856), který byl pozorován již v 19. století, ale první aplikace MST jako

metody pro identifikaci PPI byla popsána až v roce 2010 na interakci DNA aptameru s trombinem (Baaske et al., 2010).

Během MST se monitoruje pohyb fluorescenčně značených molekul po teplotním gradientu (Obr. 5.3). Termoforéza je velmi citlivá na minimální změny konformace, náboje či velikosti molekuly při interakci (Seidel et al., 2013). Naměřená data změny fluorescence jsou využita pro stanovení disociační konstanty, termodynamických parametrů vazby, je možné rozlišit vazebný mechanismus a sledovat kinetiku reakce. Měření probíhá v malých skleněných kapilárách (experiment vyžaduje velmi malé množství analyzované látky), vzorek je v kapilárách fluorescenčně označen a je excitován z objektivu. Teplotní výchylka je navozena pomocí infračerveného (IR) laseru. Při zkoumání disociační konstanty jsou postupně měřeny vzorky v kapilárách o přesné koncentraci a postupně je zvyšována koncentrace interagujícího ligandu za současného sledování vlivu na termoforézu (Mao et al., 2015).

Podstatnou výhodou MST oproti ITC a SPR je možnost analyzovat nezředěné buněčné lyzáty, které jsou mnohem blíže fyziologickým podmínkám než naředěné roztoky (Phillip and Schreiber, 2013).



Obr. 5.3: Schéma MST experimentu. V průběhu je zaznamenávána změna fluorescence navázaného fluoroforu (znázorněn zelenou hvězdičkou). Molekuly se mohou nacházet v roztoku ve dvou stavech, navzájem interagující (s vazbou), případně bez interakcí. Při MST dochází k zahřívání vzorku pomocí infračerveného (IR) laseru, který způsobí pohyb molekul pryč od excitované oblasti. Jakmile je IR laser vypnutý, molekuly difundují zpět. Dojde-li k interakci mezi proteiny, lze pozorovat změny v difuzi oproti stavu bez vazby. Převzato a upraveno (Mrozowich et al., 2019).

6. Závěr

Proteinové interakce jsou zásadní pro veškeré děje v živých buňkách. Díky novým a zdokonaleným metodám je možné hledání nových interagujících proteinů a charakterizace procesů, na kterých se podílí. Výzkum PPI je taktéž zajímavý pro vývoj nových léčiv, díky hledání nových ligandů a popisu jejich vazeb. Experimentální průzkum doplňuje *in silico* výzkum, poskytuje nová data a potvrzuje či zamítá existenci předpokládaných PPI.

Metody představené v této práci jsou děleny do pěti celků. Blízkostí indukované značení poskytuje možnost označení pravděpodobných interagujících proteinů v živých buňkách a díky připojení kovalentních značek, lze pak pravděpodobné interagující proteiny izolovat. Díky rozvoji nových typů značení a optimalizaci enzymu jsou tyto metody velmi vhodné zejména pro experimenty *in vivo*, shrnutí Tab. 6.1. Metody založené na síťování proteinů jsou jedny z nejdéle používaných. Kovalentní vazba mezi proteiny poskytuje možnost zachycení i transientních a slabých interakcí. Velký pokrok pro síťování proteinů poskytla inkorporace nekanonických aminokyselin přímo do struktury studovaného proteinu. Metody založené na detekci fluorescence poskytují možnost sledovat interakce v reálném čase a v jednotlivých subcelulárních kompartmentech. V neposlední řadě metody biofyzikální stanovující nejenom kinetické a termodynamické parametry přispívají k charakterizaci vazeb mezi interagujícími proteiny.

Vzhledem k širokému rozsahu metod, je možné zvolit vhodné metody dle předpokládané lokalizace, experimentálního organismu a požadovaných výstupech analýzy. Je vhodné metody vhodně doplňovat pro potvrzení a ujasnění výsledných dat.

Enzym	Původ	Velikost [kDa]	Optimální teplota	Doba značení	Radius [nm]
APEX	hrách	28	37	1 min	<20
APEX2	sója	28	37	1 min	<20
BioID	*E. coli*	35	37	18-24 h	~10
BioID2	*A. aeolicus*	25	37	18-24 h	~10
AirID	*E. coli*	37	26	3-24 h	~10
miniTurbo	*E. coli*	28	25	>10 min	~10
TurboID	*E. coli*	35	25	>10 min	~10
HRP	křen	44	37	10 min až 2 h	200-300
PUP-IT	*Mycobacteria*	54	37	24 h	NA

Tabulka 6.1: Shrnutí metod blízkostí indukovaného značení

Literatura

Philipp Baaske, Christoph J. Wienken, Philipp Reineck, Stefan Duhr, and Dieter Braun. Optical thermophoresis for quantifying the buffer dependence of aptamer binding. *Angewandte Chemie - International Edition*, 49(12):2238–2241, mar 2010. ISSN 14337851. doi: 10.1002/anie.200903998. URL http://dx.doi.org/10.1002/anie.200903998.

Jonas Barandun, Cyrille L. Delley, and Eilika Weber-Ban. The pupylation pathway and its role in mycobacteria, nov 2012. ISSN 17417007. URL http://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1741-7007-10-95.

Emmanuel Baslé, Nicolas Joubert, and Mathieu Pucheault. Protein Chemical Modification on Endogenous Amino Acids. *Chemistry and Biology*, 17(3):213–227, 2010. ISSN 10745521. doi: 10.1016/j.chembiol.2010.02.008. URL http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2010. 02.008.

Dorothy Beckett, Elena Kovaleva, and Peter J. Schatz. A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation. *Protein Science*, 8(4):921–929, 1999. ISSN 0961-8368. doi: 10.1110/ps.8.4.921.

* Claude Berney and Gaudenz Danuser. FRET or no FRET: A quantitative comparison. *Biophysical Journal*, 84(6):3992–4010, 2003. ISSN 00063495. doi: 10.1016/S0006-3495(03)75126-1.

B. Bhaskar, Chad E. Immoos, Hideaki Shimizu, Filip Sulc, Patrick J. Farmer, and Thomas L. Poulos. A novel heme and peroxide-dependent tryptophan–tyrosine cross-link in a mutant of cytochrome c peroxidase. *Journal of Molecular Biology*, 328(1):157–166, 2003. ISSN 0022-2836. doi: https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00179-7. URL https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283603001797.

Tess C. Branon, Justin A. Bosch, Ariana D. Sanchez, Namrata D. Udeshi, Tanya Svinkina, Steven A. Carr, Jessica L. Feldman, Norbert Perrimon, and Alice Y. Ting. Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nature Biotechnology*, 36(9):880–898, 2018. ISSN 15461696. doi: 10.1038/nbt.4201. URL http://dx.doi.org/10.1038/nbt.4201.

Kevin R Brown and Igor Jurisica. Online predicted human interaction database. *Bioinformatics*, 21(9):2076–2082, 2005.

* J Brunner. New Photolabeling and Crosslinking Methods. *Annual Review of Biochemistry*, 62(1):483–514, 1993. ISSN 00664154. doi: 10.1146/annurev.biochem.62.1.483.

K Mark Bushell, Christian Söllner, Benjamin Schuster-Boeckler, Alex Bateman, and Gavin J Wright. Large-scale screening for novel low-affinity extracellular protein interactions. *Genome research*, 18 (4):622–630, 2008.

Vandana Chakravartty and John E Cronan. Altered regulation of escherichia coli biotin biosynthesis in bira superrepressor mutant strains. *Journal of bacteriology*, 194(5):1113–1126, 2012.

Anne Chapman-Smith and John E. Cronan. The enzymatic biotinylation of proteins: A post-translational modification of exceptional specificity. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(9):359–363, 1999. ISSN 09680004. doi: 10.1016/S0968-0004(99)01438-3.

Andrew Chatr-aryamontri, Rose Oughtred, Lorrie Boucher, Jennifer Rust, Christie Chang, Nadine K. Kolas, Lara O'Donnell, Sara Oster, Chandra Theesfeld, Adnane Sellam, Chris Stark, Bobby-Joe Breitkreutz, Kara Dolinski, and Mike Tyers. The BioGRID interaction database: 2017 update. *Nucleic Acids Research*, 45(D1):D369–D379, 12 2016. ISSN 0305-1048. doi: 10.1093/nar/gkw1102. URL https://doi.org/10.1093/nar/gkw1102.

Allan L Chen, Elliot W Kim, Justin Y Toh, Ajay A Vashisht, Andrew Q Rashoff, Christina Van, Amy S Huang, Andy S Moon, Hannah N Bell, Laurent A Bentolila, et al. Novel components of the toxoplasma inner membrane complex revealed by bioid. *MBio*, 6(1), 2015.

Minghai Chen, Chuang Yan, Luping Zheng, and Xian En Zhang. The smallest near-infrared fluorescence complementation system for imaging protein-protein and RNA-protein interactions. *Chemical Science*, 13(4):1119–1129, 2022. ISSN 20416539. doi: 10.1039/d1sc04839b.

E. Y. Chi and W. R. Henderson. Ultrastructure of mast cell degranulation induced by eosinophil peroxidase: Use of diaminobenzidine cytochemistry by scanning electron microscopy. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 32(3):337–341, jan 1984. ISSN 00221554. doi: 10.1177/32.3.6420461. URL https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/32.3.6420461.

Kelvin F. Cho, Tess C. Branon, Sanjana Rajeev, Tanya Svinkina, Namrata D. Udeshi, Themis Thoudam, Chulhwan Kwak, Hyun Woo Rhee, In Kyu Lee, Steven A. Carr, and Alice Y. Ting. Split-TurboID enables contact-dependent proximity labeling in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(22), 2020. ISSN 10916490. doi: 10.1073/pnas.1919528117.

* Robert M. Clegg. Fluorescence resonance energy transfer. *Current Opinion in Biotechnology*, 6(1): 103–110, 1995. ISSN 09581669. doi: 10.1016/0958-1669(95)80016-6.

Irene Coin. Application of non-canonical crosslinking amino acids to study protein–protein interactions in live cells. *Current Opinion in Chemical Biology*, 46:156–163, 2018. ISSN 18790402. doi: 10.1016/j.cbpa.2018.07.019. URL https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.07.019.

Didiana Cruz-Lopez, Dianne Ramos, Gloria Castilloveitia, and Thomas Schikorski. Quintuple labeling in the electron microscope with genetically encoded enhanced horseradish peroxidase. *PLOS ONE*, 13(7):1–15, 07 2018. doi: 10.1371/journal.pone.0200693. URL https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200693.

Grazyna Dabrowska, Aleksandra Kata, Anna Goc, Magdalena Szechyńska-Hebda, and Edyta Skrzypek. Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 49(1):7–17, 2007. ISSN 00015296.

K. Heran Darwin, Sabine Ehrt, José Carlos Gutierrez-Ramos, Nadine Weich, and Carl F. Nathan. The Proteasome of Mycobacterium tuberculosis Is Required for Resistance to Nitric Oxide. *Science*, 302(5652):1963–1966, dec 2003. ISSN 00368075. doi: 10.1126/science.1091176. URL https://science.sciencemag.org/content/302/5652/1963https://science.sciencemag.org/content/302/5652/1963.abstract.

Abhijit De, Andreas Markus Loening, and Sanjiv Sam Gambhir. An improved bioluminescence resonance energy transfer strategy for imaging intracellular events in single cells and living subjects. *Cancer Research*, 67(15):7175–7183, 2007. ISSN 00085472. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4623.

Abhijit De, Pritha Ray, Andreas Markus Loening, and Sanjiv Sam Gambhir. BRET3: a red-shifted bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based integrated platform for imaging protein-protein interactions from single live cells and living animals. *The FASEB Journal*, 23(8):2702–2709, 2009. ISSN 0892-6638. doi: 10.1096/fj.08-118919.

Ernie De Boer, Patrick Rodriguez, Edgar Bonte, Jeroen Krijgsveldt, Eleni Katsantoni, Albert Heckt, Frank Grosveld, and John Strouboulis. Efficient biotinylation and single-step purification of tagged transcription factors in mammalian cells and transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(13):7480–7485, 2003. ISSN 00278424. doi: 10.1073/pnas.1332608100.

Dharmendra Dingar, Manpreet Kalkat, Pak Kei Chan, Tharan Srikumar, Swneke D. Bailey, William B. Tu, Etienne Coyaud, Romina Ponzielli, Max Kolyar, Igor Jurisica, Annie Huang, Mathieu Lupien, Linda Z. Penn, and Brian Raught. BioID identifies n ovel c -MYC i nteracting p artners i n cultured cells and xenograft tumors. *Journal of Proteomics*, 118:95–111, apr 2015. ISSN 18767737. doi: 10.1016/j.jprot.2014.09.029. URL https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.09.029.

Gyorgy Dorman and Glenn D Prestwich. Benzophenone photophores in biochemistry. *Biochemistry*, 33 (19):5661–5673, 1994. doi: https://doi.org/10.1021/bi00185a001.

R. R. Duncan. Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) to quantify protein-protein interactions inside cells. *Biochemical Society Transactions*, 34(5):679–682, 2006. ISSN 03005127. doi: 10.1042/BST0340679.

Th Förster. Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. *Annalen der physik*, 437(1-2): 55–75, 1948.

Ernesto Freire, Obdulio L. Mayorga, and Martin Straume. Isothermal Titration. *Analytical Chemistry*, 62(18):950A–959A, 1990. ISSN 15206882. doi: 10.1021/ac00217a002.

Jennifer L. Furman, Mingchao Kang, Seihyun Choi, Yu Cao, Erik D. Wold, Sophie B. Sun, Vaughn V. Smider, Peter G. Schultz, and Chan Hyuk Kim. A genetically encoded aza-michael acceptor for

covalent cross-linking of protein-receptor complexes. *Journal of the American Chemical Society*, 136 (23):8411–8417, 2014. ISSN 15205126. doi: 10.1021/ja502851h.

Indraneel Ghosh, Andrew D Hamilton, Lynne Regan, Yale Uni V, and New Ha V. Antiparallel Leucine Zipper-Directed Protein Reassembly : Application to the Green Fluorescent Protein Department of Molecular Biophysics and Biochemistry The dissection and subsequent reassembly of a protein from peptidic fragments provides an avenue for. (11):5658–5659, 2000.

Gerald W. Gordon, Gail Berry, Xiao Huan Liang, Beth Levine, and Brian Herman. Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence m icroscopy. *Biophysical Journal*, 74(5):2702–2713, 1998. ISSN 00063495. doi: 10.1016/S0006-3495(98)77976-7. URL http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77976-7.

J. G. Gordon and S. Ernst. Surface plasmons as a probe of the electrochemical interface. *Surface Science*, 101(1-3):499–506, dec 1980. ISSN 0039-6028. doi: 10.1016/0039-6028(80)90644-5.

N Michael Green. Avidin. In *Advances in protein chemistry*, volume 29, pages 85–133. Elsevier, 1975.

Raik Grünberg, Julia V. Burnier, Tony Ferrar, Violeta Beltran-Sastre, François Stricher, Almer M. Van Der Sloot, Raquel Garcia-Olivas, Arrate Mallabiabarrena, Xavier Sanjuan, Timo Zimmermann, and Luis Serrano. Engineering of weak helper interactions for high-efficiency FRET probes. *Nature Methods*, 10(10):1021–1027, 2013. ISSN 15487091. doi: 10.1038/nmeth.2625.

Mary P. Hall, James Unch, Brock F. Binkowski, Michael P. Valley, Braeden L. Butler, Monika G. Wood, Paul Otto, Kristopher Zimmerman, Gediminas Vidugiris, Thomas MacHleidt, Matthew B. Robers, Hélène A. Benink, Christopher T. Eggers, Michael R. Slater, Poncho L. Meisenheimer, Dieter H. Klaubert, Frank Fan, Lance P. Encell, and Keith V. Wood. Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. *ACS Chemical Biology*, 7(11):1848–1857, 2012. ISSN 15548929. doi: 10.1021/cb3002478.

Yisu Han, Tess Caroline Branon, Jeffrey D. Martell, Daniela Boassa, David Shechner, Mark H. Ellisman, and Alice Ting. Directed Evolution of Split APEX2 Peroxidase. *ACS Chemical Biology*, 14(4):619–635, 2019. ISSN 15548937. doi: 10.1021/acschembio.8b00919.

Sarah K. Henke and John E. Cronan. Successful conversion of the Bacillus subtilis BirA group II biotin protein ligase into a group I ligase. *PLoS ONE*, 9(5), 2014. ISSN 19326203. doi: 10.1371/journal.pone.0096757.

Nobumasa Hino, Yuko Okazaki, Takatsugu Kobayashi, Akiko Hayashi, Kensaku Sakamoto, and Shigeyuki Yokoyama. Protein photo-cross-linking in mammalian cells by site-specific incorporation of a photoreactive amino acid. *Nature Methods*, 2(3):201–206, 2005. ISSN 15487091. doi: 10.1038/nmeth739.

Elizabeth A. Hoffman, Brian L. Frey, Lloyd M. Smith, and David T. Auble. Formaldehyde crosslinking: A tool for the study of chromatin complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 290(44):26404–26411, 2015. ISSN 1083351X. doi: 10.1074/jbc.R115.651679. URL http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R115.651679.

* Jiri Homola, Sinclair S. Yee, and Gunter Gauglitz. Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 54(1):3–15, 1999. ISSN 09254005. doi: 10.1016/S0925-4005(98)00321-9.

Koichi Honke. Biological functions of sulfoglycolipids and the EMARS method for identification of co-clustered molecules in the membrane microdomains. *Journal of Biochemistry*, 163(4):253–263, 2018. ISSN 17562651. doi: 10.1093/jb/mvx078.

Koichi Honke and Norihiro Kotani. Dentification of cell-surface molecular interactions under living conditions by using the enzyme-mediated activation of radical sources (EMARS) method. *Sensors (Switzerland)*, 12(12):16037–16045, 2012. ISSN 14248220. doi: 10.3390/s121216037.

* Chang Deng Hu and Tom K. Kerppola. Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nature Biotechnology*, 21(5):539–545, 2003. ISSN 10870156. doi: 10.1038/nbt816.

Huan Hu, Hongmin Zhang, Sheng Wang, Miao Ding, Hui An, Yingping Hou, Xiaojing Yang, Wensheng Wei, Yujie Sun, and Chao Tang. Live visualization of genomic loci with BiFC-TALE. *Scientific Reports*, 7(September 2016):1–8, 2017. ISSN 20452322. doi: 10.1038/srep40192. URL http://dx.doi.org/10.1038/srep40192.

Meng-Sen Huang, Wen-Ching Lin, Jen-Hsuan Chang, Cheng-Hung Cheng, Han Ying Wang, and Kurt Yun Mou. The cysteine-free single mutant c32s of apex2 is a highly expressed and active fusion tag for proximity labeling applications. *Protein Science*, 28(9):1703–1712, 2019. doi: https://doi.org/10.1002/pro.3685. URL https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/ 10.1002/pro.3685.

Gregory B. Hurst, Trish K. Lankford, and Stephen J. Kennel. Mass spectrometric detection of affinity purified crosslinked peptides. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 15(6):832–839, 2004. ISSN 10440305. doi: 10.1016/j.jasms.2004.02.008.

Lakshminarayan M. Iyer, A. M. Burroughs, and L. Aravind. Unraveling the biochemistry and provenance of pupylation: A prokaryotic analog of ubiquitination. *Biology Direct*, 3:1–7, 2008. ISSN 17456150. doi: 10.1186/1745-6150-3-45.

Kees Jalink. HiFRET: Some tailwind for FRET resolves weak protein interactions. *Nature Methods*, 10(10):947–948, 2013. ISSN 15487091. doi: 10.1038/nmeth.2652. URL http://dx.doi.org/ 10.1038/nmeth.2652.

Songlin Jiang, Norihiro Kotani, Tomoko Ohnishi, Arisa Miyagawa-Yamguchi, Masayuki Tsuda, Ryusuke Yamashita, Yoshihito Ishiura, and Koichi Honke. A proteomics approach to the cell-surface interactome using the enzyme-mediated activation of radical sources reaction. *Proteomics*, 12(1):54–62, 2012. ISSN 16159853. doi: 10.1002/pmic.201100551.

Emily J Kabeiseman, Kyle H Cichos, and Elizabeth R Moore. The eukaryotic signal sequence, ygrl, targets the chlamydial inclusion. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 4:129, 2014.

Madiha Khan, Ji Young Youn, Anne Claude Gingras, Rajagopal Subramaniam, and Darrell Desveaux. In planta proximity dependent biotin identification (BioID). *Scientific Reports*, 8(1):1–8, dec 2018. ISSN 20452322. doi: 10.1038/s41598-018-27500-3. URL www.nature.com/scientificreports/.

Shagufta H. Khan, Kriszta Farkas, Raj Kumar, and Jun Ling. A versatile method to measure the binding to basic proteins by surface plasmon resonance. *Analytical Biochemistry*, 421(2):385–390, 2012. ISSN 10960309. doi: 10.1016/j.ab.2011.12.006. URL http://dx.doi.org/10.1016/j.ab. 2011.12.006.

Kohki Kido, Satoshi Yamanaka, Shogo Nakano, Kou Motani, Souta Shinohara, Akira Nozawa, Hidetaka Kosako, Sohei Ito, and Tatsuya Sawasaki. Airid, a novel proximity biotinylation enzyme, for analysis of protein–protein interactions. *eLife*, 9, 2020. ISSN 2050084X. doi: 10.7554/eLife.54983.

Dae In Kim and Kyle J. Roux. Filling the Void: Proximity-Based Labeling of Proteins in Living Cells. *Trends in Cell Biology*, 26(11):804–817, 2016. ISSN 18793088. doi: 10.1016/j.tcb.2016.09.004. URL http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2016.09.004.

Dae In Kim, K. C. Birendra, Wenhong Zhu, Khatereh Motamedchaboki, Valérie Doye, and Kyle J. Roux. Probing nuclear pore complex architecture with proximity-dependent biotinylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(24):2453–2461, 2014. ISSN 10916490. doi: 10.1073/pnas.1406459111.

* Jeremy R Knowles. The mechanism of biotin-dependent enzymes. *Annual review of biochemistry*, 58 (1):195–221, 1989.

Norihiro Kotani, Jianguo Gu, Tomoya Isaji, Keiko Udaka, Naoyuki Taniguchi, and Koichi Honke. Biochemical visualization of cell surface molecular clustering in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(21):7405–7409, 2008. ISSN 00278424. doi: 10.1073/pnas.0710346105.

Max Kotlyar, Chiara Pastrello, Nicholas Sheahan, and Igor Jurisica. Integrated interactions database: tissue-specific view of the human and model organism interactomes. *Nucleic Acids Research*, 44 (D1):D536–D541, 10 2015. ISSN 0305-1048. doi: 10.1093/nar/gkv1115. URL https://doi.org/10.1093/nar/gkv1115.

Keehwan Kwon, Emily D Streaker, Shreyesh Ruparelia, and Dorothy Beckett. Multiple disordered loops function in corepressor-induced dimerization of the biotin repressor. *Journal of molecular biology*, 304(5):821–833, 2000.

Michelle Lajko, Alexander F Haddad, Carolyn A Robinson, and Sarah A Connolly. Using proximity biotinylation to detect herpesvirus entry glycoprotein interactions: limitations for integral membrane glycoproteins. *Journal of virological methods*, 221:81–89, 2015.

Stephanie S. Lam, Jeffrey D. Martell, Kimberli J. Kamer, Thomas J. Deerinck, Mark H. Ellisman, Vamsi K. Mootha, and Alice Y. Ting. Directed evolution of APEX2 for electron microscopy and proximity labeling. *Nature Methods*, 12(1):51–54, 2014. ISSN 15487105. doi: 10.1038/nmeth.3179.

Marc Larochelle, Danny Bergeron, Bruno Arcand, and François Bachand. Proximity-dependent biotinylation mediated by TurboID to identify protein-protein interaction networks in yeast. *Journal of Cell Science*, 132(11), jun 2019. ISSN 14779137. doi: 10.1242/jcs.232249.

Valerie Le Sage, Alessandro Cinti, Fernando Valiente-Echeverría, and Andrew J Mouland. Proteomic analysis of hiv-1 gag interacting partners using proximity-dependent biotinylation. *Virology journal*, 12(1):1–5, 2015.

Jianli Li, Yue Wang, Shu Ling Chiu, and Hollis T. Cline. Membrane targeted horseradish peroxidase as a marker for correlative fluorescence and electron microscopy studies. *Frontiers in Neural Circuits*, 4 (FEB):1–10, 2010. ISSN 16625110. doi: 10.3389/neuro.04.006.2010.

Xue Wen Li, Johanna S. Rees, Peng Xue, Hong Zhang, Samir W. Hamaia, Bailey Sanderson, Phillip E. Funk, Richard W. Farndale, Kathryn S. Lilley, Sarah Perrett, and Antony P. Jackson. New insights into the DT40 B cell receptor cluster using a proteomic proximity labeling assay. *Journal of Biological Chemistry*, 289(21):14434–14447, 2014. ISSN 1083351X. doi: 10.1074/jbc.M113.529578. URL http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M113.529578.

Bo Liedberg, Claes Nylander, and Ingemar Lunström. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and actuators*, 4:299–304, 1983. doi: https://doi.org/10.1016/0250-6874(83)85036-7.

Qiupeng Lin, Zejiao Zhou, Wanbin Luo, Maichun Fang, Meiru Li, and Hongqing Li. Screening of Proximal and Interacting Proteins in Rice Protoplasts by Proximity-Dependent Biotinylation. *Frontiers in Plant Science*, 8:749, may 2017. ISSN 1664-462X. doi: 10.3389/fpls.2017.00749. URL http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.00749/full.

Laurence Lins, Annick Thomas, and Robert Brasseur. Analysis of accessible surface of residues in proteins. *Protein Science*, 12(7):1406–1417, 2003. ISSN 09618368. doi: 10.1110/ps.0304803.

* Chang C. Liu and Peter G. Schultz. Adding new chemistries to the genetic code. *Annual Review of Biochemistry*, 79(1):413–444, 2010. doi: 10.1146/annurev.biochem.052308.105824. URL https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.105824. PMID: 20307192.

Qiang Liu, Jun Zheng, Weiping Sun, Yinbo Huo, Liye Zhang, Piliang Hao, Haopeng Wang, and Min Zhuang. A proximity-tagging system to identify membrane protein–protein interactions. *Nature Methods*, 15(9):715–722, 2018. ISSN 15487105. doi: 10.1038/s41592-018-0100-5. URL http://dx.doi.org/10.1038/s41592-018-0100-5.

C Ludwig. *Diffusion zwischen ungleich erwärmten Orten gleich zusammengesetzter Lösung*. Aus der KK Hof-und Staatsdruckerei, in Commission bei W. Braumüller . . . , 1856.

Andrea Mair, Shou Ling Xu, Tess C. Branon, Alice Y. Ting, and Dominique C. Bergmann. Proximity labeling of protein complexes and cell type specific organellar proteomes in Arabidopsis enabled by TurboID. *eLife*, 8, sep 2019. ISSN 2050084X. doi: 10.7554/eLife.47864.

Yexuan Mao, Lanlan Yu, Ran Yang, Ling Bo Qu, and Perter De B. Harrington. A novel method for the study of molecular interaction by using microscale thermophoresis. *Talanta*, 132:894–901, 2015. ISSN 00399140. doi: 10.1016/j.talanta.2014.09.038. URL http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.09.038.

Jeffrey D. Martell, Thomas J. Deerinck, Yasemin Sancak, Thomas L. Poulos, Vamsi K. Mootha, Gina E. Sosinsky, Mark H. Ellisman, and Alice Y. Ting. Engineered ascorbate peroxidase as a genetically encoded reporter for electron microscopy. *Nature Biotechnology*, 30(11):1143–1148, 2012. ISSN 10870156. doi: 10.1038/nbt.2375. URL http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2375.

Jeffrey D. Martell, Masahito Yamagata, Thomas J. Deerinck, Sébastien Phan, Carolyn G. Kwa, Mark H. Ellisman, Joshua R. Sanes, and Alice Y. Ting. A split horseradish peroxidase for the detection of intercellular protein-protein interactions and sensitive visualization of synapses. *Nature Biotechnology*, 34(7):774–780, 2016. ISSN 15461696. doi: 10.1038/nbt.3563.

Sean A. McKinney, Christopher S. Murphy, Kristin L. Hazelwood, Michael W. Davidson, and Loren L. Looger. A bright and photostable photoconvertible fluorescent protein. *Nature Methods*, 6(2):131–133, jan 2009. ISSN 15487091. doi: 10.1038/nmeth.1296. URL https://www.nature.com/articles/nmeth.1296.

Paul E. Morin and Ernesto Freire. Direct Calorimetric Analysis of the Enzymatic Activity of Yeast Cytochrome c Oxidase. *Biochemistry*, 30(34):8494–8500, aug 1991. ISSN 15204995. doi: 10.1021/bi00098a030. URL https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00098a030.

Tyler Mrozowich, Vanessa Meier-Stephenson, and Trushar R. Patel. Microscale thermophoresis: Warming up to a new biomolecular interaction technique. *Biochemist*, 41(2):8–12, 2019. ISSN 17401194. doi: 10.1042/bio04102008.

D. R. Müller, P. Schindler, H. Towbin, U. Wirth, H. Voshol, S. Hoving, and M. O. Steinmetz. Isotope-tagged cross-linking reagents. A new tool in mass spectrometric protein interaction analysis. *Analytical Chemistry*, 73(9):1927–1934, 2001. ISSN 00032700. doi: 10.1021/ac001379a.

Hoang Hiep Nguyen, Jeho Park, Sebyung Kang, and Moonil Kim. Surface plasmon resonance: A versatile technique for biosensor applications. *Sensors (Switzerland)*, 15(5):10481–10510, 2015. ISSN 14248220. doi: 10.3390/s150510481.

Tuan-Anh Nguyen, Marko Cigler, and Kathrin Lang. Expanding the Genetic Code to Study Protein-Protein Interactions. *Angewandte Chemie*, 130(44):14548–14559, 2018. ISSN 0044-8249. doi: 10.1002/ange.201805869.

* Irene M.A. Nooren and Janet M. Thornton. Diversity of protein-protein interactions. *EMBO Journal*, 22(14):3486–3492, 2003. ISSN 02614189. doi: 10.1093/emboj/cdg359.

Menno J Oudhoff, Spencer A Freeman, Amber L Couzens, Frann Antignano, Ekaterina Kuznetsova, Paul H Min, Jeffrey P Northrop, Bernhard Lehnertz, Dalia Barsyte-Lovejoy, Masoud Vedadi, et al. Control of the hippo pathway by set7-dependent methylation of yap. *Developmental cell*, 26(2):188–194, 2013.

William R. Patterson and Thomas L. Poulos. Crystal Structure of Recombinant Pea Cytosolic Ascorbate Peroxidase. *Biochemistry*, 34(13):4331–4341, sep 1995. ISSN 15204995. doi: 10.1021/bi00013a023. URL https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bi00013a023.

* James R. Perkins, Ilhem Diboun, Benoit H. Dessailly, Jon G. Lees, and Christine Orengo. Transient Protein-Protein Interactions: Structural, Functional, and Network Properties. *Structure*, 18(10):1233–1243, 2010. ISSN 09692126. doi: 10.1016/j.str.2010.08.007. URL http://dx.doi.org/10. 1016/j.str.2010.08.007.

Kevin D.G. Pfleger and Karin A. Eidne. Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Nature methods*, 3(3):165–174, 2006. ISSN 15487091. doi: 10.1038/nmeth841.

Kevin D.G. Pfleger, Jasmin R. Dromey, Matthew B. Dalrymple, Esther M.L. Lim, Walter G. Thomas, and Karin A. Eidne. Extended bioluminescence resonance energy transfer (eBRET) for monitoring prolonged protein-protein interactions in live cells. *Cellular Signalling*, 18(10):1664–1670, 2006. ISSN 08986568. doi: 10.1016/j.cellsig.2006.01.004.

Yael Phillip and Gideon Schreiber. Formation of protein complexes in crowded environments-From in vitro to in vivo. *FEBS Letters*, 587(8):1046–1052, 2013. ISSN 00145793. doi: 10.1016/j.febslet.2013.01.007. URL http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2013.01.007.

* Michael M. Pierce, C. S. Raman, and Barry T. Nall. Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 19(2):213–221, 1999. ISSN 10462023. doi: 10.1006/meth.1999.0852.

* Marjetka Podobnik, Nada Kraševec, Apolonija Bedina Zavec, Omar Naneh, Ajda Flašker, Simon Caserman, Vesna Hodnik, and Gregor Anderluh. How to study protein-protein interactions. *Acta Chimica Slovenica*, 63(3):424–439, 2016. ISSN 15803155. doi: 10.17344/acsi.2016.2419.

Domenik Prozeller, Svenja Morsbach, and Katharina Landfester. Isothermal titration calorimetry as a complementary method for investigating nanoparticle-protein interactions. *Nanoscale*, 11(41):19265–19273, 2019. ISSN 20403372. doi: 10.1039/c9nr05790k.

Emma L. Raven, Latesh Lad, Katherine H. Sharp, Martin Mewies, and Peter C.E. Moody. Defining substrate specificity and catalytic mechanism in ascorbate peroxidase, mar 2004. ISSN 00678694. URL /biochemsocsymp/article/doi/10.1042/bss0710027/50364/Defining-substrate-specificity-and-catalytic.

Hyun Woo Rhee, Peng Zou, Namrata D. Udeshi, Jeffrey D. Martell, Vamsi K. Mootha, Steven A. Carr, and Alice Y. Ting. Proteomic mapping of mitochondria in living cells via spatially restricted enzymatic tagging. *Science*, 339(6125):1328–1331, 2013. ISSN 10959203. doi: 10.1126/science.1230593.

Christopher Ritchie, Isabel Cylinder, Emily J Platt, and Eric Barklis. Analysis of hiv-1 gag protein interactions via biotin ligase tagging. *Journal of virology*, 89(7):3988–4001, 2015.

Harekrushna Sahoo. Förster resonance energy transfer - A spectroscopic nanoruler: Principle and applications. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 12(1):20–30, 2011. ISSN 13895567. doi: 10.1016/j.jphotochemrev.2011.05.001. URL http://dx.doi.org/ 10.1016/j.jphotochemrev.2011.05.001.

Susanne A.I. Seidel, Patricia M. Dijkman, Wendy A. Lea, Geert van den Bogaart, Moran Jerabek-Willemsen, Ana Lazic, Jeremiah S. Joseph, Prakash Srinivasan, Philipp Baaske, Anton Simeonov, Ilia Katritch, Fernando A. Melo, John E. Ladbury, Gideon Schreiber, Anthony Watts, Dieter Braun, and Stefan Duhr. Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions. *Methods*, 59(3):301–315, 2013. ISSN 10959130. doi: 10.1016/j.ymeth.2012.12.005. URL http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.12.005.

* Andrea Sinz. Chemical cross-linking and mass spectrometry to map three-dimensional protein structures and protein-protein interactions. *Mass Spectrometry Reviews*, 25(4):663–682, 2006. ISSN 02777037. doi: 10.1002/mas.20082.

* Jamie Snider, Max Kotlyar, Punit Saraon, Zhong Yao, Igor Jurisica, and Igor Stagljar. Fundamentals of protein interaction network mapping. *Molecular Systems Biology*, 11(12):848, 2015. ISSN 1744-4292. doi: 10.15252/msb.20156351.

Frank Striebel, Frank Imkamp, Markus Sutter, Martina Steiner, Azad Mamedov, and Eilika Weber-Ban. Bacterial ubiquitin-like modifier pup is deamidated and conjugated to substrates by distinct but homologous enzymes. *Nature structural & molecular biology*, 16(6):647–651, 2009.

Lubert Stryer. Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annual review of biochemistry*, 47 (1):819–846, 1978.

Monika Suchanek, Anna Radzikowska, and Christoph Thiele. Photo-leucine and photo-methionine allow identification of protein-protein interactions in living cells. *Nature Methods*, 2(4):261–267, 2005. ISSN 15487091. doi: 10.1038/nmeth752.

Weiping Sun, Yinbo Huo, Yuxuan Mei, Qingtong Zhou, Suwen Zhao, and Min Zhuang. Identification of a small probe that can be conjugated to proteins by proximity labeling. *ACS chemical biology*, 15(1):39–43, 2019. doi: 10.1021/acschembio.9b00842. URL https://doi.org/10.1021/acschembio.9b00842.

* Sutherland, Toews J, and Kast J. Utility of formaldehyde cross-linking and mass spectrometry in the study of protein-protein interactions. *Journal of mass spectrometry : JMS*, 43(6):699–715, jun 2008. ISSN 1076-5174. doi: 10.1002/JMS.1415. URL https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/ 18438963/.

Markus Sutter, Fred F Damberger, Frank Imkamp, Frédéric H-T Allain, and Eilika Weber-Ban. Prokaryotic ubiquitin-like protein (pup) is coupled to substrates via the side chain of its c-terminal glutamate. *Journal of the American Chemical Society*, 132(16):5610–5612, 2010.

Xiaoting Tang and James E. Bruce. A new cross-linking strategy: Protein interaction reporter (PIR) technology for protein-protein interaction studies. *Molecular BioSystems*, 6(6):939–947, 2010. ISSN 1742206X. doi: 10.1039/b920876c.

Bruce J. Tromberg, Natasha Shah, Ryan Lanning, Albert Cerussi, Jennifer Espinoza, Tuan Pham, Lars Svaasand, and John Butler. Non-invasive in vivo characterization of breast tumors using photon migration spectroscopy. *Neoplasia*, 2(1-2):26–40, 2000. ISSN 15228002. doi: 10.1038/sj.neo.7900082. URL http://dx.doi.org/10.1038/sj.neo.7900082.

J. F. Turrens and A. Boveris. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *The Biochemical journal*, 191(2):421–427, nov 1980. ISSN 02646021. doi: 10.1042/bj1910421. URL /biochemj/article/191/2/421/17773/Generation-of-superoxide-anion-by-the-NADH.

Christina M Van Itallie and James Melvin Anderson. Claudin interactions in and out of the tight junction. *Tissue barriers*, 1(3):e25247, 2013.

⋆ Nigel C. Veitch. Horseradish peroxidase: A modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65(3): 249–259, 2004. ISSN 00319422. doi: 10.1016/j.phytochem.2003.10.022.

Karen G. Welinder. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology*, 2(3):388–393, jun 1992. ISSN 0959440X. doi: 10.1016/0959-440X(92)90230-5.

Karen Gjesing Welinder. Covalent structure of the glycoprotein horseradish peroxidase (EC 1.11.1.7). *FEBS Letters*, 72(1):19–23, 1976. ISSN 00145793. doi: 10.1016/0014-5793(76)80804-6.

⋆ W David Wilson. Analyzing biomolecular interactions. *Science*, 295(5562):2103–2105, 2002. doi: 10.1126/science.295.5562.2103.

Thomas Wiseman, Samuel Williston, John F. Brandts, and Lung Nan Lin. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Analytical Biochemistry*, 179(1): 131–137, 1989. ISSN 10960309. doi: 10.1016/0003-2697(89)90213-3.

Zheng Xiang, Haiyan Ren, Ying S. Hu, Irene Coin, Jing Wei, Hu Cang, and Lei Wang. Adding an unnatural covalent bond to proteins through proximity-enhanced bioreactivity. *Nature Methods*, 10 (9):885–888, 2013. ISSN 15487091. doi: 10.1038/nmeth.2595.

Zheng Xiang, Vanessa K. Lacey, Haiyan Ren, Jing Xu, David J. Burban, Patricia A. Jennings, and Lei Wang. Proximity-enabled protein crosslinking through genetically encoding haloalkane unnatural amino acids. *Angewandte Chemie - International Edition*, 53(8):2190–2193, 2014. ISSN 14337851. doi: 10.1002/anie.201308794.

Yao Xu, David W. Piston, and Carl Hirschie Johnson. A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: Application to interacting circadian clock proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(1):151–156, 1999. ISSN 00278424. doi: 10.1073/pnas.96.1.151.

Miaomiao Xue, Junjie Hou, Linlin Wang, Dongwan Cheng, Jingze Lu, Li Zheng, and Tao Xu. Optimizing the fragment complementation of APEX2 for detection of specific protein-protein interactions in live cells. *Scientific Reports*, 7(1):1–8, 2017. ISSN 20452322. doi: 10.1038/s41598-017-12365-9. URL http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-12365-9.

* Janos Zempleni. Uptake, localization, and noncarboxylase roles of biotin. *Annu. Rev. Nutr.*, 25:175–196, 2005.

Susan Zhang, Kristin E Burns-Huang, Guido V Janssen, Huilin Li, Huib Ovaa, Lizbeth Hedstrom, and K Heran Darwin. Mycobacterium tuberculosis proteasome accessory factor a (pafa) can transfer prokaryotic ubiquitin-like protein (pup) between substrates. *MBio*, 8(1), 2017.

Yongliang Zhang, Gaoyuan Song, Neeraj K. Lal, Ugrappa Nagalakshmi, Yuanyuan Li, Wenjie Zheng, Pin jui Huang, Tess C. Branon, Alice Y. Ting, Justin W. Walley, and Savithramma P. Dinesh-Kumar. TurboID-based proximity labeling reveals that UBR7 is a regulator of N NLR immune receptor-mediated immunity. *Nature Communications*, 10(1), 2019. ISSN 20411723. doi: 10.1038/s41467-019-11202-z. URL http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-11202-z.

* označeny sekundární citace