

FRET-СЕНСОР ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ АКТИВАЦИИ КАСПАЗЫ-8

Жердева В. В.¹, Ивашина Т. В.^{1,2}, Горященко А. С.¹, Савицкий А. П.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии им. А. Н. Баха Российской академии наук, Москва, Россия (119071, Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2), e-mail: ASGoryash@yandex.ru

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина Российской академии наук, Московская область, г. Пущино, Россия (142290, Московская область, г. Пущино, проспект Науки, дом 5)

Апоптоз является общебиологическим механизмом, ответственным за поддержание постоянства численности клеточных популяций и выбраковку дефектных клеток. Нарушение регуляции апоптоза приводит к возникновению различных заболеваний, связанных с усилением или, наоборот, ингибированием апоптоза. За морфологические и биохимические изменения, происходящие в течение апоптоза, ответственны каспазы, относящиеся к семейству цистеиновых протеаз. Основным эффекторным ферментом в процессе апоптоза является каспаза-3, тогда как маркером более ранних событий апоптоза может служить детекция активации каспазы-8. Одновременная детекция активности каспаз 3 и 8 поможет предварительно оценить, запущен ли процесс апоптоза или активация каспазы-8 вызвана другим сценарием клеточного ответа, на какой стадии апоптоза находится клетка, а также путь активации апоптоза. Целью данной работы являлась характеристика свойств генетически кодируемого FRET-сенсора каспазы-8 TagRFP-IETD-KFP на основе красных флуоресцентных белков TagRFP и KFP. В результате экспериментов по динамическому светорассеянию гидродинамический радиус сенсора составил 5,9 нм, что в приближении сферической модели соответствует молекулярной массе 213 кДа и тетрамерной форме белка в растворе. Значение эффективности FRET в сенсоре было рассчитано из спектральных данных и составило 56%. Наконец, флуоресцентными методами и по изменению времени жизни флуоресценции донора был продемонстрирован эффективный гидролиз сенсора каспазой-8 *in vitro*.

Ключевые слова: апоптоз, каспаза-8, флуоресцентные белки, FRET-сенсоры.

FRET-SENSOR FOR DETERMINATION OF CASPASE-8 ACTIVITY

Zherdeva V. V.¹, Ivashina T. V.^{1,2}, Goryashchenko A. S.¹, Savitsky A. P.¹

¹A. N. Bach Institute of biochemistry RAS, Moscow, Russia (119071, Moscow, Leninsky prospekt, 33 build. 2), e-mail: ASGoryash@yandex.ru

²G. K. Skryabin Institute of biochemistry and physiology of microorganisms RAS», Moscow region, Pushchino, Russia (142290, Moscow region, Pushchino, prospekt Nauki, 5)

Apoptosis is a general biological mechanism which is responsible for maintaining constant the number of cell populations and culling of defective cells. Dysregulation of apoptosis leads to the emergence of various diseases associated with increased or, conversely, inhibition of apoptosis. Specific cysteine proteases – caspases – are responsible for the morphological and biochemical changes that occur during apoptosis. The main effector enzyme in apoptosis is caspase-3, whereas the earlier event marker of apoptosis is the caspase-8 activation. Simultaneous detection of the activity of caspases 3 and 8 will help to understand whether running process of apoptosis or activation of caspase-8 is caused by different scenario of the cellular response, at what stage is the cell apoptosis and activation pathway of apoptosis. The aim of this study was to characterize properties of genetically encoded caspase-8 FRET-sensor TagRFP-IETD-KFP which is based on red fluorescent proteins TagRFP and KFP. The dynamic light scattering experiments showed that hydrodynamic radius of the sensor was 5.9 nm, which in spherical model approach corresponds to the molecular weight of 213 kDa and tetrameric form of the protein in solution. FRET efficiency value in the sensor was calculated from the spectral data and was 56%. Finally, by means of fluorescence intensity and fluorescence lifetime measurements efficient hydrolysis of the sensor by caspase-8 *in vitro* was demonstrated.

Keywords: apoptosis, caspase-8, fluorescent proteins, FRET-sensors.

Введение

Апоптоз представляет собой один из вариантов программируемой клеточной гибели. Индукция апоптоза и активация проапоптотических белков ведет к активации каспаз (цистеиновых протеаз) [1,6], которые делятся на инициаторные (2, 8, 9, 10) и эффекторные каспазы (3, 6, 7). Активация эффекторных каспаз является конечной стадией перед запуском протеолитического каскада реакций, ведущего к гибели клетки. Маркером более ранних событий апоптоза может служить детекция активации каспазы-8 при внешнем (рецепторном) пути активации апоптоза, которая происходит с поверхности клеточной мембраны при взаимодействии специфических рецепторов с растворимыми молекулами семейства фактора некроза опухоли (ФНО-подобными лигандами). Кроме того, недавно продемонстрирована роль каспазы 8 как инструмента некроза [2,4,7]. Таким образом, детектируя одновременно активацию каспазы-8 и каспазы-3, можно дискриминировать пути активации клеточной гибели: внешний или внутренний путь активации каспазы-3 или же активация другого пути программируемой клеточной гибели или клеточного ответа. Кроме того, активация каспаз не всегда ведет к гибели клетки. На некоторых моделях показано, что активация инициаторных каспаз связана не только с апоптозом, но и с противовоспалительным ответом клетки [3,5]. Поэтому регистрация ранних событий апоптоза, определяемых активацией каспазы-8 в отсутствие последующей активации каспазы-3, может рассматриваться как маркер запуска иных программируемых процессов в клетке.

Цель исследования

Целью данной работы стало изучение свойств генетически кодируемого FRET-сенсора каспазы-8 TagRFP-IETD-KFP, представляющего собой пару флуоресцентных белков TagRFP и KFP, соединенных гибким полипептидным линкером GTGGSGGIETDGTGGSGDPPVAT, содержащим тетрапептид IETD, специфически распознаваемый и гидролизуемый каспазой-8.

Материалы и методы

Очистка полученного сенсора

Клетки E.coli штамм BL21(DE3), содержащие белок TagRFP-IETD-KFP, осаждали центрифугированием (20 мин при 4 тыс. об/мин, 4°C), суспендировали в буфере 20 мМ Трис·HCl, pH 7.8, 0.15M NaCl и разрушали с помощью френч-пресса. После разрушения клеток очистка полученного лизата проводилась с помощью гель-фильтрационной хроматографии на носителе Superdex 200 10/300 GL с использованием хроматографа AKTA purifier производства компании GE Healthcare (Швеция). Скорость элюирования составляла 0.5 мл/мин. Рабочий буфер: 150 мМ NaCl; 20 мМ Tris·HCl pH = 8,7. Регистрация поглощения выполнялась на двух длинах волн – 280 и 560 нм. Целевой белок собирали по поглощению на 560 нм.

Калибровка колонки была выполнена с помощью стандартов для гель-фильтрации производства компании BioRad (Thyroglobulin (bovine) – 670 kDa; γ -globulin (bovine) – 158 kDa; Ovalbumin (chicken) – 44 kDa; Myoglobin (horse) – 17 kDa; Vitamin B₁₂ – 1,35 kDa).

Калибровочная кривая была получена путем построения зависимости коэффициента распределения $K_{av} = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$ от десятичного логарифма молекулярной массы (Mr) стандартов, где V_e – объем элюирования, V_0 – мертвый объем и V_t – общий объем колонки. Молекулярную массу белка определяли методом электрофореза в денатурирующих условиях по Лэммли в 12 % ПААГ на приборе MiniProtean II (Bio-Rad, США), с использованием набора маркеров молекулярных масс белков (Fermentas, США).

Измерение гидродинамического радиуса исследуемых сенсоров методом динамического светорассеивания

Для измерения гидродинамического радиуса использовали установку DynaPro Titan и программного обеспечения Dynamics 6.6.7.9 производства Wyatt Technology (США). Измерения проводили при температуре образца 25 °С, интенсивность лазерного облучения составляла 100 %. Для интерпретации результатов использовали предустановленную модель (MW-R model) «Globular Proteins». Для каждого измерения, в соответствии с рекомендациями производителя, было установлено время накопления сигнала 10 с и 10 измерений на один эксперимент. Определение олигомерного состояния проводили на основе данных о гидродинамическом радиусе исследуемого белка с помощью программного обеспечения Dynamics 6.6.7.9 (Wyatt Technology, США).

Определение эффективности переноса энергии в конструкции TagRFP-IETD-KFP

Спектры поглощения образцов TagRFP и конструкции TagRFP-IETD-KFP в буфере 150мМ NaCl; 20 мМ Трис-НСl рН 8,7 регистрировались на спектрофотометре Cary 300 (Varian,USA). Затем на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, USA) регистрировались спектры флуоресценции этих же образцов при возбуждении флуоресценции на длине волны 532 нм. На основании полученных спектров по формуле (1) была рассчитана эффективность переноса энергии в конструкции TagRFP-IETD-KFP.

$$E = 1 - n = 1 - (S_{em} / D_{TagRFP}) / (S/D) \quad (1),$$

Где S_{em} – площадь под спектром эмиссии флуоресценции конструкции, D_{TagRFP} – значение оптической плотности TagRFP в конструкции на длине волны 532 нм, S – площадь под спектром эмиссии флуоресценции индивидуального TagRFP, D – значение оптической плотности индивидуального TagRFP на длине волны 532 нм.

Для нахождения D_{TagRFP} было проведено разложение спектра поглощения TagRFP на два пика с помощью разложения Гаусса и определены положения и полуширины пиков. Спектры поглощения конструкции разложили с помощью четырёх Гауссов, после чего

просуммировали оптические плотности каждой из двух компонент TagRFP на длине волны 532 нм в спектре поглощения конструкции.

Определение эффективности расщепления генетически кодируемого субстрата TagRFP-IETD-KFP

Белок слияния был отдиализован к буферу 100 mM NaCl, 50 mM HEPES, 10 mM DTT, 1 mM ЭДТА, 10 % глицерин, 0,5 % CHAPS, pH 7,4. Концентрация сенсора, используемая в эксперименте, равнялась 1,4 мкМ. К 93 мкл раствора субстрата добавляли 7 мкл каспазы-8 (100 ед/мкл), тщательно перемешивали и инкубировали в течение 24 часов при температуре 37 °С. Измерения спектров флуоресценции проводили на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, USA) при возбуждении светом с длиной волны 532 нм.

Для измерения времени жизни флуоресценции субстратов использовался флуоресцентный спектрометр с временным разрешением FluoTime 200 (Picoquant GmbH, Германия). Кинетики затухания флуоресценции белков обрабатывались по уравнению (1) с помощью программного обеспечения FluoFit (Picoquant GmbH, Германия):

$$I(t) = \sum_{i=1}^n A_i \cdot e^{-t/\tau_i} \quad (1)$$

Расщепление исследуемого сенсора было также продемонстрировано с помощью электрофореза в денатурирующих условиях по Лэммли в 15 % ПААГ на приборе MiniProtean II (Bio-Rad, США), с использованием набора маркеров молекулярных масс белков (Fermentas, США).

Результаты и обсуждение

Характеристика степени созревания сенсора

По данным ПААГ-электрофореза в элюате находится достаточно чистый образец TagRFP-IETD-KFP. При этом наблюдаются две основные полосы – 37 и 18 кДа, в то время как в районе 26 кДа белковых фракций нет. Поскольку при созревании KFP в полипептидной цепи образуется разрыв, наблюдаемые полосы можно сопоставить соответственно форме субстрата с созревшим KFP (37 кДа) и фрагменту KFP, образовавшимся в результате разрыва полипептидной цепи (18 кДа).

Определение олигомерного состояния сенсора

Результаты гель-фильтрации говорят о том, что субстрат TagRFP-IETD-KFP в основном выходит в виде фракции, молекулярная масса которой составляет около 236 кДа, следовательно, так как масса цельной конструкции составляет 55 кДа, белок выходит в форме тетрамера.

В результате экспериментов по динамическому светорассеянию было вычислено, что гидродинамический радиус белка TagRFP-IETD-KFP равен 5,9 нм, что в приближении сферической модели соответствует молекулярной массе, равной 213 кДа, соответствующей тетрамерной форме белка. Таким образом, белок слияния TagRFP-IETD-KFP представляет собой тетрамер.

Определение эффективности переноса энергии

Для оценки эффективности переноса энергии в сенсоре TagRFP-IETD-KFP было найдено отношение квантовых выходов TagRFP в составе сенсора и в виде индивидуального белка: $n = (S_{em}/D_{TagRFP532})/(S/D) = 44 \%$, т.е. в полученной конструкции происходит индуктивно-резонансный перенос энергии, эффективность которого составляет $E = 100 \% - 44 \% = 56 \%$.

Гидролиз сенсора TagRFP-IETD-KFP каспазой-8 *in vitro*

В соответствии с рисунком 1 интенсивность флуоресценции возрастает приблизительно на 60 %.

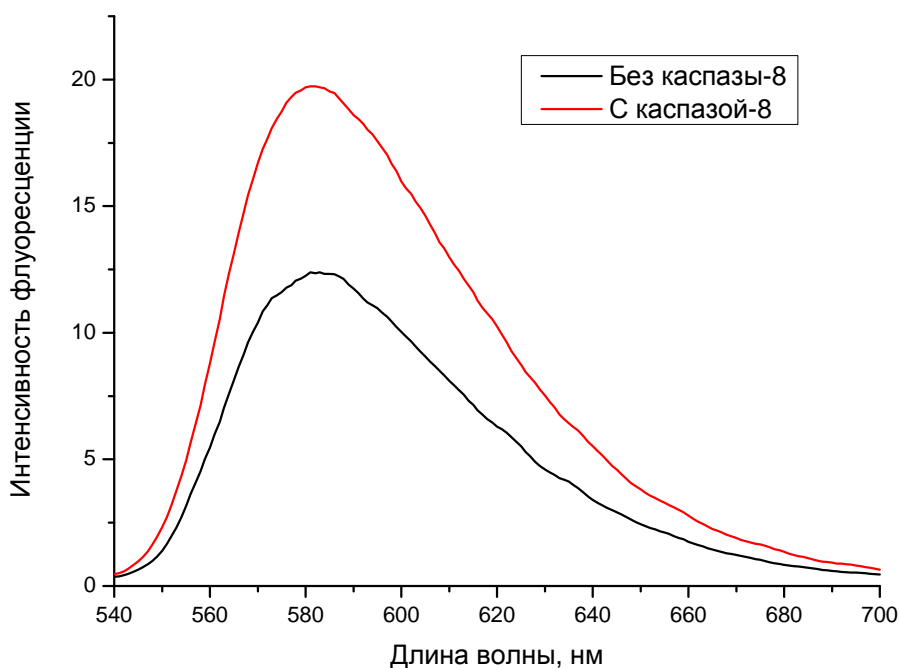


Рисунок 1. Спектр флуоресценции конструкции TagRFP-IETD-KFP до (чёрная линия) и после (красная) обработки каспазой-8

Таким образом, спектры флуоресценции свидетельствуют об эффективном расщеплении линкера под действием каспазы-8.

Детекцию гидролиза TagRFP-IETD-KFP каспазой-8 проводили также путем измерения времени жизни флуоресценции донора до и после добавления фермента. Кинетика затухания флуоресценции цельного субстрата описывается с помощью двух экспонент с временами

жизни 2,4 и 1,3 нс, характеризующих расщепленный и цельный субстрат соответственно. Соотношение этих компонент до добавления каспазы-8 составляет 29 % к 71 %. В результате гидролиза каспазой-8 соотношение компонент изменяется до 50 % к 50 %, что также подтверждает расщепление субстрата и демонстрирует возможность детекции активности каспазы-8 по изменению времени жизни образца в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1. Времена жизни и предэкспоненциальные множители для цельного и расщепленного субстрата TagRFP-IETD-KFP

	$\tau_{1, \text{нс}}$	$\tau_{2, \text{нс}}$	A_1	A_2
Без каспазы	2,2	1,1	1816 (29 %)	4475 (71 %)
С каспазой	2,3	1,1	2833 (50 %)	2865 (50 %)

Таким образом, кинетика затухания флуоресценции конструкции TagRFP-IETD-KFP описывается двумя экспонентами, и в результате гидролиза каспазой-8 изменяется соотношение их амплитуд, что позволяет детектировать активность фермента. Детекцию активности каспазы-8 с помощью сенсора TagRFP-IETD-KFP можно проводить по изменению интенсивности флуоресценции и по времени жизни флуоресценции.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки по государственному контракту № 14.512.11.0023.

Список литературы

- 1 Chen M. Initiator caspases in apoptosis signaling pathways / M. Chen, J. Wang // Apoptosis. – 2002. – V.7. – P. 313-319.
- 2 Kaiser W. J. [и др.] RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice // Nature. – 2011. – V. 471. – N. 3. – P. 368-372.
- 3 Kovalenko A. [и др.] Caspase – 8 deficiency in epidermal keratinocytes triggers an inflammatory skin diseases // J. Exp. Med. – 2009. – V. 206. – N. 10. – P. 2161-2177.
- 4 Oberst A. [и др.] Catalytic activity of the caspase-8–FLIPL complex inhibits RIPK3-dependent necrosis // Nature. – 2011. – V. 471(7338). – P. 363-367.
- 5 Shi Y. Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis/ Y. Shi // Molecular Cell. – 2002. – V. 9. – P. 459-470.
- 6 Thornberry, N. A. Caspases: enemies within / N. A. Thornberry, Y. Lazebnik // Science. – 1998. – V. 281. – P. 1312-1316.

7 Zhan H. [и др.] Functional complementation between FADD and RIP1 in embryos and lymphocytes // Nature. – 2011. – V. 471. – P. 373-376.

Рецензенты:

Королева О. В., д.б.н., зав. лабораторией Молекулярных основ биотрансформаций Института биохимии им. А. Н. Баха РАН, г.Москва.

Шишкин С. С., д.б.н., профессор, зав. лабораторией Биомедицинских исследований Института биохимии им. А. Н. Баха РАН, г.Москва.