

Разработка подхода к исследованию свойств каспазы-3 методом детекции флуоресценции одиночных молекул

¹Грановский И.Э., ¹Холод Н.С., ¹Шляпников М.Г., ²Соловьев И.Д., ²Гавшина А.В.,
²Савицкий А.П.

¹Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН)

²Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук; lci857@gmail.com

Ферменты являются ключевыми элементами метаболизма. Они катализируют множество разнообразных химических реакций, протекающих в организме в процессе его жизнедеятельности. Катализ химической реакции - это динамический процесс, включающий в себя стадии связывания субстрата, собственно катализа и высвобождения продуктов реакции. Развитие технологий флуоресцентной микроскопии сделало возможным проводить исследования единичных молекул фермента, т.е. фактически наблюдать за катализом в режиме реального времени в миллисекундном или секундном временном диапазоне. Это позволяет определять константы скоростей прямой и обратной реакций без применения технологий быстрого смешивания, что открывает новые возможности в изучении механизмов катализа и регуляции активности ферментов. Одна из технологий анализа одиночных молекул - TIRFM (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy) позволяет возбуждать флуоресценцию в тонком приповерхностном слое и наблюдать лишь иммобилизованные флуоресцирующие ферментативные комплексы. Альтернативно, может быть использован конфокальный режим измерения флуоресценции с фокусировкой на поверхности в точке иммобилизации фермента.

Данная работа направлена на адаптацию метода анализа флуоресценции одиночных молекул для исследования энзиматических свойств и регуляции активности каспазы-3 - одного из ключевых факторов апоптоза. Апоптоз, или программируемая клеточная гибель, выполняет множество важных функций в многоклеточном организме, включая поддержание гомеостаза и морфогенез, а также элиминацию зараженных клеток при вирусной инфекции. Каспаза-3 синтезируется в виде неактивного пропрекурсора, который существует в форме гомодимера. Она является одной из трех эффекторных каспаз, активация которых переводит апоптотическую гибель клетки в необратимую стадию. Как следствие, процессы активации и активность каспазы-3 находятся под строгим контролем клетки. Некоторые сложные вирусы, например, такие как вирус африканской чумы свиней, также кодируют белки, регулирующие активность каспазы-3 для подавления клеточного противовирусного ответа. Исследования энзиматических свойств и механизмов регуляции активности каспазы-3 помимо фундаментального, имеют также прикладное значение с точки зрения разработки новых подходов к противовирусной устойчивости животных.

Для исследования ферментативных свойств каспазы-3 методом детекции флуоресценции одиночных молекул, мы разработали систему получения пропрекурсора каспазы-3 в гетеродимерной форме: одна ее субъединица слита на С-конце с биотинилирующимся пептидом Avi-tag, тогда как С-конец другой субъединицы помечен молекулой eGFP, а также содержит кальмодулинсвязывающий пептид. ОРС химерных субъединиц пропрекурсора каспазы-3, а также ген *birA* биотин-лигазы - для более эффективного биотинилирования Avi-tag *in vivo* - были совместно экспрессированы в клетках *E. coli*. Очистку химерной каспазы-3 из клеток проводили с использованием хроматографии на носителях с иммобилизованным кальмодулином и стрептавидином.

Для проведения измерений на микроскопе были предложены две схемы проточной системы непрерывной подачи растворов в область наблюдения. В первом случае

изготавливалась основа из полиметилметакрилата с отверстиями для капилляров. Далее крепился слой из двусторонней клейкой ленты, в которой с помощью лазерной резки были выполнены протоки между отверстиям в основе. Последним слоем выступает покровное стекло, которое является подложкой для иммобилизации. Во втором случае использовали основу из полидиметилсилоксана, которая была получена заливкой в форму с нанесенными на стекло протоками. Такая основа имеет хорошую адгезию к покровному стеклу, раствор к протокам поступает через металлические капилляры из шприцевых игл диаметром 0,6 мм.

Для иммобилизации каспазы-3 использовали систему «стрептавидин – биотин». Первым слоем наносили смесь БСА с биотинилированным БСА, а затем последовательно стрептавидин и иммобилизуемый фермент. После каждой стадии вели промывку и контроль чистоты наносимого препарата на наличие флуоресцирующих примесей. Для получения флуоресцирующих пятен отдельных молекул подбиралась степень разрежения биотинилированных центров на подложке путем варьирования соотношения БСА/БСА-биотин. Принцип регистрации констант взаимодействий основывается на анализе статистики времен (“on” и “off” времен) пребывания лиганда в области иммобилизованного фермента. В качестве субстрата выбран рекомбинантный FRET-субстрат, гидролизуемый каспазой-3 – TagRFP-23-KFP.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-29-08010.