



УДК 577.152.344\*22'14

СЕНСОРЫ АКТИВНОСТИ КАСПАЗ<sup>1</sup>© 2019 г. О. А. Злобовская\*, М. В. Ширманова\*\*, Т. Ф. Ковалева\*\*, К. С. Саркисян\*,  
Е. В. Загайнова\*\*, К. А. Лукьянов\*, \*\*, #\*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
Россия, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10\*\*Приволжский исследовательский медицинский университет,  
Россия, 603005, Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1

Поступила в редакцию 22.03.2018 г.

После доработки 01.06.2018 г.

Принята к печати 14.06.2018 г.

Цистеиновые протеазы каспазы играют важную роль в процессе программируемой клеточной гибели. В апоптозе, независимо от исходного стимула, сигнальные пути пересекаются на эффекторных каспазах, ключевой из которых является каспаза-3. В настоящем обзоре мы рассматриваем сенсоры активности каспазы-3 и некоторых других каспаз. За последние десять лет было создано множество таких сенсоров на разнообразных принципах детекции, из которых самыми распространенными являются флуоресценция и люминесценция, а особый интерес представляют внутриклеточные сенсоры, которые позволяют визуализировать активацию каспаз в живых системах. Мы кратко описываем сенсоры различного дизайна, преимущества и недостатки которых необходимо учитывать при выборе сенсора для конкретной экспериментальной системы.

*Ключевые слова:* каспаза, апоптоз, сенсор, ферстеровский резонансный перенос энергии, флуоресцентный белок, люцифераза

DOI: 10.1134/S013234231806012X

## ВВЕДЕНИЕ

Каспазы (англ. caspase – cysteine-dependent aspartate-directed protease, КФ 3.4.22) – это семейство цистеиновых протеаз, которые играют важную роль в развитии программируемой клеточной гибели и некоторых других процессах [1–5]. Работа каспаз регулируется на посттрансляционном уровне, что обеспечивает возможность их быстрой активации. Каспазы синтезируются в виде неактивных предшественников – прокаспаз, которые состоят из продомена, временно дезактивирующего фермент, а также малой и большой субъединиц.

Каспазы, которые участвуют в апоптозе, разделяют на инициаторные (каспаза-2, -8, -9, -10), которые разрезают и таким образом активируют другие каспазы, и эффекторные (каспаза-3, -6, -7),

действующие на иные клеточные мишени. У инициаторных каспаз дезактивирующий продомен больше, чем у эффекторных, и может включать такие домены как CARD (caspase recruitment domain, например у каспазы-2 и каспазы-9) или DED (death effector domain, например у каспазы-8 и -10), которые позволяют прокаспазам взаимодействовать с их активаторами. При наличии стимула исходно мономерные инициаторные прокаспазы собираются в кластеры, в которых происходит протеолитическое расщепление связи между малой и большой субъединицами. Было показано, что активация инициаторных прокаспаз происходит за счет их олигомеризации, а не протеолиза [6, 7]. Далее активированные инициаторные каспазы активируют эффекторные прокаспазы путем расщепления их полипептидной цепи между большой и малой субъединицами. Эффекторные каспазы, в свою очередь, разрезают другие белковые мишени и непосредственно участвуют в апоптотическом изменении клетки.

Каспазные каскады могут быть активированы разными стимулами, например:

– гранзимом Б (сериновая протеаза, выделяемая цитотоксическими Т-лимфоцитами и НК-клетка-

<sup>1</sup> Сокращения: FCS – fluorescence correlation spectroscopy, флуоресцентная корреляционная спектроскопия; FLIM – fluorescence lifetime imaging microscopy, микроскопия времен жизни флуоресценции; FRET – Förster resonance energy transfer, ферстеровский резонансный перенос энергии, GFP – green fluorescent protein, зеленый флуоресцентный белок, TIRFM – total internal reflection fluorescence microscopy, микроскопия полного внутреннего отражения.

# Автор для связи: Тел.: +7(916)561-62-21; эл. почта: kluk@ibch.ru.

ми), который может напрямую активировать эффекторные каспазы-3 и -7 [8];

– “рецепторами смерти” (например, Fas, TRAIL-рецепторами или рецепторами TNF), что приводит к активации инициаторных каспаз-8 и -10 [9];

– апоптосомой митохондриального происхождения (регулируется цитохромом *c* и семейством Bcl-2 белков), которая активирует инициаторную каспазу-9.

Однако каким бы ни был исходный стимул, все пути апоптоза пересекаются на эффекторных каспазах, ключевой из которых является каспаза-3.

#### *Свойства каспазы-3 и ее влияние на физиологию клетки*

Каспаза-3 – цитозольный фермент. Как и другие эффекторные каспазы, каспаза-3 сначала находится в неактивном димерном состоянии, для выхода из которого необходимо протеолитическое расщепление по определенным остаткам аспаргатов, осуществляемое каспазами-8, -9 и -10 [10, 11]. Образующиеся две субъединицы, большая и малая, остаются в составе димера и формируют активный фермент, способный расщеплять белки [12, 13].

Большая часть субстратов каспазы-3 может быть разделена на две категории: 1) регуляторы апоптоза, которые активируются или инактивируются при расщеплении каспазой и 2) белки “домашнего хозяйства” (от англ. housekeeping – белки, поддерживающие важнейшие жизненные функции клетки), чье расщепление необходимо для контролируемой деградации клетки. Ниже мы рассмотрим каждую из этих категорий подробнее.

1) *Влияние каспазы-3 на регуляторы апоптоза* (по [14]).

– При инициации апоптоза каспаза-3 блокирует передачу сигнала ростовых факторов, осуществляя протеолиз G4-Gd1-белка из семейства Rho-GTP-аз, а также нарушает работу других сигнальных каскадов, расщепляя различные изоформы протеинкиназы C. При рецептор-зависимом апоптозе каспаза-3 расщепляет факторы транскрипции, например ингибиторную субъединицу IκBα фактора транскрипции NF-κB. Это прерывает сигналы выживания, связанные с активацией NF-κB при распознавании рецепторов tumor necrosis factor (TNF).

– Благодаря каспазе-3 повышается активность белков-ингибиторов клеточного цикла p21<sup>WAF1</sup> и p27<sup>KIP1</sup> и происходит дефосфорилирование Rb-белка, что приводит к остановке клеточного цикла.

– Опухолевый супрессор p53 активирует каспазу-3, а она, в свою очередь, гидролизует его не-

гативный регулятор MDM2, обеспечивая таким образом положительную обратную связь;

– Каспаза 3 может дополнительно активировать каспазы-6, -7 и -9.

2) *Влияние на белки “домашнего хозяйства”.*

– Расщепляя фактор инициации трансляции eIF4G (отвечает за связывание рибосомы с мРНК), каспаза-3 осуществляет ингибирование трансляции [14].

– Расщепление poly(ADP-Rib)-полимеразы и ингибитора нуклеазы DFF40/CAD – DFF45/ICAD (DNA-Fragmenting Factor / Inhibitor of Caspase Activated DNase) приводит к фрагментации клеточной ДНК [15].

– При повышении лимита диффузии высокомолекулярных белков через ядерные поры, каспаза-3 входит в ядро и расщепляет ядерные белки LAP2 и нуклеопорин Nup153; совместно с ядерной активностью каспазы-6 это приводит к дезорганизации хроматина, сморщиванию ядра и его фрагментации [14].

– Структурные белки цитоскелета актин и фодрин тоже являются субстратами каспазы-3 [16]. Кроме того, она может дестабилизировать адгезивные контакты, ингибируя ассоциацию β-катенина с E-кадгерином [9].

В последние годы становится все более понятно, что помимо участия в апоптозе, у каспазы-3 есть ряд других функций, связанных с регуляцией клеточного цикла, дифференцировки клеток и эмбриональным развитием.

Так, например, каспаза-3 тормозит клеточное деление, влияя на сигнальный Wnt-каскад. Ее отсутствие приводит к повышенному уровню циклина D1, являющегося важным компонентом контрольной точки, в которой клетка решает, поделится ей или перейти в состояние покоя. Было выдвинуто предположение, что каспаза-3 продлевает G1-фазу клеточного цикла [9].

Показано также, что ограниченная активность каспазы-3 необходима для корректной работы синапсов нейронов [17, 18], для обучения и памяти у животных, например, у птиц [19] и крыс [20, 21].

Функции каспазы-3 не ограничиваются пределами клетки, в которой она была синтезирована. Активация каспазы-3 в апоптотических клетках может оказывать противоположный, стимулирующий пролиферацию эффект на соседние, неапоптотические клетки. Высказано предположение, что процесс регенерации окружающей ткани зависит от работы каспазы-3 в умирающих клетках, поскольку она воздействует на сигнальные пути соседних клеток. Например, каспаза-3 активирует кальций-независимую фосфолипазу A2 (iPLA2), которая производит способную блокировать апоптоз лизофосфатидную кислоту, а также арахидоновую кислоту, которая увеличивает

миграцию соседних клеток [22]. Кроме того, исследование на мышах показали, что активация каспазы-3 индуцирует фактор роста соединительной ткани, что увеличивает фиброгенез [23].

Паракринный стимулирующий эффект от каспаз-зависимого апоптоза был также показан и для  $\beta$ -клеток островков Лангерганса [24]. Более того, активность каспазы-3 в опухолевых клетках, подвергнутых радиотерапии, может вызвать репопуляцию опухоли за счет выделения простагландина  $E_2$ , стимулирующего деление окружающих клеток [25]. Таким образом, активность каспазы-3 представляет существенный интерес как для научных исследований, так и для медицины.

Основным сайтом узнавания каспазы-3 является последовательность DEVD — каспаза вносит разрыв в белковую цепь после нее. Однако, каспаза-3, как и многие другие каспазы, обладает высокой протеолитической активностью также и по сайтам, которые считаются мишенями других каспаз (рисунок) [26]. Например, сайт узнавания каспазы-9 LEHD гидролизуется, причем даже с большей эффективностью, каспазами-3, -6, -8 и -10. В свою очередь, последовательность DEVD расщепляется не только каспазой-3, но и каспазой-7 и, в небольшой степени, каспазами-6 и -8. При создании и использовании сенсоров активности каспаз следует помнить об этих свойствах: на сегодняшний день не существует сенсора, специфичного только к одной каспазе.

### Сенсоры для детекции активности каспазы-3

#### 1. Внеклеточные сенсоры для детекции активности каспазы-3

Активность каспазы-3 можно детектировать внеклеточно, используя протеолиз DEVD-содержащих пептидов как механизм срабатывания сенсора. Например, широко представлены *in vitro*-сенсоры, основанные на детекции активности каспазы-3 с помощью специально подготовленной поверхности. На ней иммобилизуют вещества, содержащие аминокислотный линкер, несущий в своем составе сайт разрезания каспазой-3 — DEVD (далее в тексте для краткости обозначения линкера будет использована эта аббревиатура). В зависимости от типа соединений, регистрация может осуществляться разными методами.

В некоторых исследованиях используется метод поверхностного плазмонного резонанса и атомно-силовая микроскопия [27–29]. Электрохимическая платформа для непрямо́й детекции каспазы-3 основана на стеклоуглеродном электроде с золотыми наночастицами с иммобилизованными биотинилированным линкером DEVD и щелочной фосфатазой. Детекцию осуществляют с помощью дифференциальной импульсной вольтамперометрии [30].

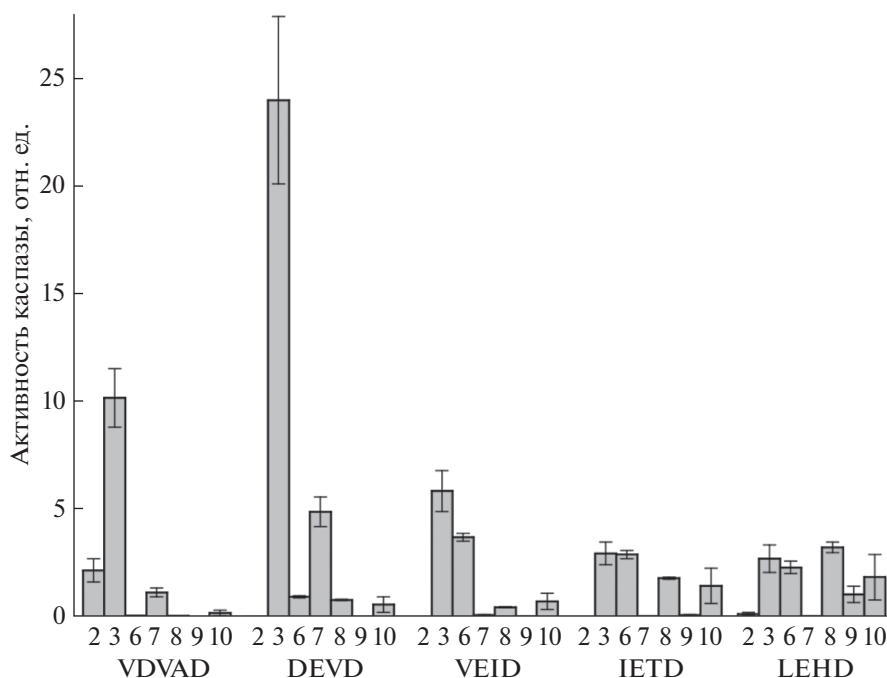
Можно также использовать изменение флуоресценции полимера, например с помощью адсорбции на нем биотинилированного линкера DEVD, несущего тушитель флуоресценции [31]. Активная каспаза-3 отрезает тушитель, что приводит к восстановлению сигнала флуоресценции.

Для детекции активности каспазы-3 используют и изменение ферстеровского резонансного переноса энергии (FRET, Förster Resonance Energy Transfer: подробнее о методе см. раздел *FRET-сенсоры*), например между квантовыми точками и флуоресцентным белком [32] или красителем [33], присоединенными к наночастицам линкером DEVD.

Был разработан частично генетически кодируемый FRET-сенсор на основе флуоресцентного белка TagRFP, соединенного линкером DEVD с пептидом, связывающим ион тербия [34]. При работе данного сенсора энергия передается от возбужденного триптофана пептида к  $Tb^{3+}$ , а от него — к хромофору TagRFP. Преимуществом данного сенсора является долгоживущая (более 100 мкс) флуоресценция ионов тербия [35]. Это позволяет детектировать FRET по долгоживущей сенсibilизированной эмиссии акцептора после 100-мкс задержки от импульса возбуждения, избегая влияния обычной наносекундной флуоресценции от прямого возбуждения TagRFP и других фоновых флуорофоров. Потенциально, данный сенсор может быть адаптирован для регистрации активности каспазы в живой клетке, однако это требует решения проблемы доставки  $Tb^{3+}$  внутрь клетки. Кроме того, для возбуждения сенсора необходим ультрафиолетовый свет (280 нм), обладающий очень высокой фототоксичностью.

Интересный подход к детекции активности каспазы-3 был предложен Кангом и соавторами на основе так называемого внутреннего (intrinsic) FRET (iFRET) [36]. iFRET заключается в переносе энергии с собственных остатков триптофана белка на краситель, конъюгированный с лигандом или ингибитором, специфически взаимодействующим с данным белком. В случае каспазы-3 таким ингибитором служил пептид DEVD с синим флуорофором в качестве FRET-акцептора и альдегидной группой для ковалентного присоединения к остатку цистеина активного центра.

Методы, основанные на подобных технологиях, подходят для скрининга лекарственных препаратов и других задач, которые не требуют визуализации процессов в одиночных клетках и сохранения интактных клеток. Кроме того, параллельная регистрация в реальном времени других апоптотических процессов такими методами затруднена. Поэтому разрабатываются и совершенствуются сенсоры, которые способны проникать внутрь клеток или синтезироваться непосредственно внутри них.



**Рис. 1.** Сравнение активности каспаз по протеолизу различных аминокислотных последовательностей (по работе [26]). Цифры под столбиками отвечают номерам каспаз, приведены также аминокислотные последовательности сайтов щепления в однобуквенном коде.

## 2. Внутриклеточные сенсоры активности каспазы-3

**Химически синтезированные сенсоры.** Спектр синтетических сенсоров активности каспазы-3 весьма многообразен. Например, некоторые экспериментальные тераностические (т.е. сочетающие в себе терапевтические и диагностические свойства) препараты содержат встроенный сенсор на каспазу, который активируется при апоптозе.

Приведем два примера. В состав одного препарата на основе платины (IV) входит конъюгат тетрафенилсилола с пептидом DEVD (исходно не флуоресцирует из-за свободного вращения фениленовых колец) [37]. При расщеплении пептида каспазой-3 гидрофобный флуорофор тетрафенилсиллол агрегирует и начинает флуоресцировать. Другой препарат на основе пиррофоеорбида представляет собой фотосенсибилизатор, соединенный линкером DEVD с тушителем флуоресценции [38]. Таким образом, на первом этапе, при освещении фотосенсибилизатор производит активные формы кислорода. На втором, когда запускается апоптоз, и каспаза разрезает линкер, тушитель уходит и возникает сигнал флуоресценции. Подобные бифункциональные конструкции — изящное решение, но, к сожалению, подходящее только для конкретного препарата.

Любые синтетические сенсоры нуждаются в доставке внутрь клетки. В качестве одного из вариантов решения этой задачи были разработаны

флуоресцентные наномицеллы (двухфотонно возбуждаемые дальнекрасным светом), которые связаны линкером DEVD с тушителем флуоресценции [39]. Эти наномицеллы легко проникают внутрь клетки и начинают флуоресцировать при отрезании тушителя каспазой. Другой пример — наноконъюгаты оксида графена с пептидом, содержащим сайт DEVD и лизин, меченный флуорофором. Оксид графена одновременно является транспортером сенсора в клетку и тушителем флуоресценции. При активации каспазы-3 флуорофор отщепляется от носителя и начинает флуоресцировать [40].

**Биолюминесцентные сенсоры.** Различные люциферазные системы являются частично генетически кодируемыми репортерами. После трансформации соответствующей генетической конструкцией клетка сама синтезирует люциферазу и начинает светиться, если добавить в питательную среду люциферин [41].

На основе биолюминесценции было создано несколько сенсоров активности каспазы-3. Первый тип сенсоров основан на использовании “сплит”-вариантов люциферазы, в которых полипептидная цепь разделена на две части, проявляющие активность только после корректного объединения. Например, сплит-домены люциферазы в составе единой полипептидной цепи могут быть не способны формировать активный белок из-за искусственно созданных стерических пре-

пятствий. После разрезания создающего стерические затруднения линкера DEVD каспазой-3, они получают необходимую свободу и реассоциируют в активную люциферазу с участием коротких взаимодействующих друг с другом пептидов [42, 43]. В другом варианте сплит-домены люциферазы разнесены на разные полипептиды, а их объединение происходит также благодаря пептидам, специфически взаимодействующим между собой, после отрезания каспазой-3 фрагмента, мешающего этому взаимодействию [44]. Основным преимуществом методов на основе сплит-доменов является многократный (в сотни раз) рост сигнала люминесценции после активации каспазы. Вместе с тем, отсутствие сигнала может означать как неапоптотическое состояние клетки, так и отсутствие в ней сенсора.

Сенсоры, основанные на резонансном переносе энергии между люциферазой и флуоресцентным белком (BRET – Bioluminescence Resonance Energy Transfer), лишены этого недостатка. При расщеплении каспазой линкера между донором и акцептором наблюдается падение BRET, которое можно наблюдать по росту отношения интенсивностей сигналов донора к акцептору [45]. Оптимизированный сенсор на основе яркой люциферазы NanoLuc и зеленого флуоресцентного белка mNeonGreen демонстрирует большой динамический диапазон (10-кратное изменение соотношения люминесценции в синей и зеленой областях спектра после разрезания каспазой) и высокую яркость, делающую возможной мониторинг активации каспазы-3 на уровне единичных живых клеток с помощью высокочувствительно го биолюминесцентного микроскопа [46].

По сравнению с флуоресцентными, биолуминесцентные сенсоры обладают следующими преимуществами. Во-первых, они позволяют избегать фототоксического воздействия на клетки возбуждающим светом высокой интенсивности. Во-вторых, детекция биолуминесценции на уровне целых организмов отличается большей чувствительностью из-за отсутствия проблемы аутофлуоресценции тканей. Вместе с тем, необходимость добавления люциферина, а также его постепенный расход в ходе эксперимента несколько ограничивают применение данного подхода.

**Генетически кодируемые флуоресцентные сенсоры.** Флуоресцентная микроскопия – мощный инструмент для визуализации динамических процессов в живых клетках на разных уровнях, от индивидуальных молекул до целых организмов. Флуоресцентные белки широко используются как неинвазивные флуоресцентные метки для отслеживания экспрессии генов, локализации или взаимодействия белков, а также в качестве био-

сенсоров [47]. На их основе создано несколько сенсоров активности различных каспаз.

Одна группа сенсоров основана на транслокации флуоресцентного белка в клетке после активации каспазы. При разрезании сенсора каспазой флуоресцентный белок транслоцируется в ядро, поскольку он несет сигнал ядерной локализации, в то время как до расщепления превалирует сигнал экспорта из ядра [48, 49]. Такой принцип действия весьма нагляден при микроскопии культур клеток, однако его сложно применять на уровне живой ткани или целого организма.

Другая группа сенсоров основана на появлении или исчезновении сигнала, что более удобно для использования *in vivo*. Например, был разработан сенсор, основанный на активации экспрессии GFP (зеленого флуоресцентного белка) в клетках в процессе апоптоза. Для этого использовали бицистронный вектор, с которого сначала транскрибируется фактор транскрипции, связанный линкером DEVD с сигналом экспорта из ядра. При отрезании каспазой этого сигнала фактор транскрипции транслоцируется в ядро, где связывается со вторым цистроном, кодирующим зеленый флуоресцентный белок, и активирует синтез данного белка, вызывая появление сигнала флуоресценции [50]. Этот принцип работы сенсора нагляден, однако также обладает недостатками. Во-первых, отсутствие сигнала может означать как неапоптотическое состояние клетки, так и отсутствие в ней сенсора. Во-вторых, при использовании этого сенсора отмечено появление фонового сигнала в отсутствие апоптоза (возможно, связанное с недостаточно эффективным сигналом внеядерной локализации). Кроме того, существенным недостатком является сильное запаздывание сигнала: время, которое требуется для активации транскрипции, накопления и созревания GFP, составляет около получаса (а то и более, поскольку в процессе апоптоза частично подавляются процессы транскрипции и трансляции).

Принцип появления флуоресцентного сигнала характерен для сенсора на основе желтого флуоресцентного белка Venus и интеина [51]. Авторы использовали циркулярно пермутированный вариант белка Venus, сшив прежние N- и C-концы линкером DEVD и добавив последовательность интеина для того, чтобы после расщепления каспазой-3 половинки Venus легче соединялись. До активации каспазы-3 конфигурация сенсора такова, что флуоресценция невозможна; сигнал возникает только при расщеплении линкера и конформационной перестройке белка. Детекция сигнала значительно ускоряется по сравнению с предыдущим описанным вариантом, поскольку в данном случае происходит лишь перестройка уже синтезированного белка, а не транскрипция и синтез новых молекул белка.

Сходная работа была посвящена разработке сенсора iCaspex, состоящего из циркулярно пермутированного биливердин-связывающего ближнеинфракрасного флуоресцентного белка IFP [52]. Его исходные *N*- и *C*-концы также соединены линкером, включающим каспазный сайт. Белок сконструирован таким образом, что в нерасщепленном состоянии хромофор не инкорпорирован в молекулу, поэтому нет сигнала флуоресценции. При активации каспазы и расщеплении сайта белок рестраивается и начинает флуоресцировать в ближнеинфракрасной области. На *N*- и *C*-концах полипептидной цепи сенсора находятся сплит-домены GFP, которые формируют функциональный флуоресцентный белок, что позволяет как удерживать вместе части сенсора после разрезания, так и использовать зеленую флуоресценцию для нормировки сигнала до и после активации каспазы. Некоторым недостатком сенсора iCaspex является его зависимость от биливердина, который присутствует в достаточном количестве не во всех тканях.

Биливердин-независимый сенсор был получен на основе сплит-варианта GFP, несущего дополнительные спирали (ZipGFP) [53]. При расщеплении ZipGFP рестраивается, и его флуоресценция разгорается в несколько раз по сравнению с первоначальным уровнем сигнала. Благодаря начальной флуоресценции нет необходимости встраивать второй белок для регистрации наличия сенсора в клетке, однако, процесс перестройки ZipGFP происходит довольно медленно (около полутора часов).

Сенсор, основанный на потере сигнала GFP, включал в состав химерного белка следующие функциональные элементы: прокаспаза-3 – линкер DEVD – убиквитин – линкер DEVD – N-degron – EGFP [54]. При апоптозе и разрезании линкеров образуются активная каспаза-3 и нестабильный, за счет присутствия на *N*-конце деградиционного мотива, EGFP, который подвергается быстрой протеосомной деградации. Одновременно, за счет активации каспазы-3 достигается эффект положительной обратной связи. С одной стороны, этот метод удобен тем, что сигнал присутствует с самого начала; с другой стороны, при некрозе сигнал EGFP также исчезнет, так что этот метод сложно использовать *in vivo*, особенно с быстродействующими лекарствами. Кроме того, дополнительно привнесенная в составе сенсора каспаза-3 может влиять на клеточные процессы.

Наконец, самой обширной группой сенсоров активности каспаз являются сенсоры на основе ферстеровского резонансного переноса энергии, FRET, при котором энергия возбужденного состояния одного из взаимодействующих флуорофоров может безызлучательно передаваться на другой [35, 55–58]. Для эффективного протекания

FRET между двумя флуорофорами необходимо соблюдение нескольких ключевых условий. Во-первых, спектр эмиссии одного флуорофора – донора, должен существенно перекрываться со спектром поглощения другого – акцептора. Во-вторых, молекулы донора и акцептора должны располагаться близко друг к другу – обычно, не дальше 5–8 нм – т.к. эффективность FRET падает пропорционально шестой степени расстояния между флуорофорами. В третьих, ориентация дипольных моментов перехода донора и акцептора должна быть близка к коллинеарной.

Использование FRET-пар делает метод детекции каспазы радиометрическим: изменение сигнала донора нормируют на сигнал акцептора (при возбуждении акцептора), вводя таким образом нормировку на различия в уровне экспрессии сенсора, а также на изменения сигнала вследствие движения и изменения формы клетки в ходе наблюдений. Помимо изменения интенсивности сигнала флуоресценции, можно использовать эффект сокращения времени жизни флуоресценции донора в составе FRET-пары. После разрезания каспазой химерного белка время жизни флуоресценции донора возрастает. Для измерения этого параметра используется технология время-разрешенной флуоресцентной микроскопии – FLIM (fluorescence lifetime imaging microscopy) [35, 59].

Крайне важно, чтобы условия наблюдения не привносили в наблюдаемую систему искажения; в случае флуоресцентной микроскопии – чтобы облучение не травмировало клетки. Сенсоры, чьи доноры флуоресцируют в наиболее “синей” области спектра, например сине-зеленый сенсор [60], нуждаются в возбуждении ультрафиолетовым светом, токсичным для клеток [61, 62].

Аналогичная проблема, хоть и в меньшей степени, возникает для цианово-желтого сенсора, однако многие исследователи используют именно такой вариант [63, 64]. В работе [64] для минимизации ущерба от возбуждающего света применили технологию TIRFM (total internal reflection fluorescence microscopy) и мембранно-связанный сенсор; при его расщеплении его желтая часть оказывалась в цитоплазме, а на мембране оставался только циановый белок. Благодаря TIRFM облучается только часть клетки, непосредственно прилегающая к стеклу, кроме того, отношение сигнал – шум существенно возрастает.

С появлением красных флуоресцентных белков, их стали использовать при создании каспазных сенсоров в качестве акцепторов FRET. Приведем несколько примеров высокоэффективных сенсоров:

– Сенсор на основе двух FRET-пар для одновременной регистрации активности каспазы-8 и каспазы-3 [65]. В этом сенсоре три флуоресцент-

ных белка (циановый seCFP, желтый Venus и красный mRFP1) в составе одной полипептидной цепи разделены линкерами IETD (сайт узнавания каспазы-8) и DEVD и образуют две FRET-пары. Хотя авторы сделали заключение об успешной визуализации последовательной активации каспаз-8 и -3 в ходе апоптоза на уровне индивидуальных клеток, при интерпретации работы такого сенсора не следует забывать о перекрестной активности каспаз, в частности, узнавании сайта IETD не только каспазой-8, но и каспазами-3, -6 и -10 (рисунк) [26].

– Сенсор на основе белков CFP и DsRed [66]. В данной работе активность каспазы наблюдали с помощью капиллярного электрофореза, но это можно делать и на уровне интактной клетки с помощью флуоресцентного микроскопа.

– Сенсор на основе мономерного зеленого и димерного дальнекрасного белка – EGFP и tHcRed; детекция осуществлялась методами FLIM и FCS (fluorescence correlation spectroscopy [67]) [68, 69].

– Сенсор CaspeR3 на основе зеленого и красного белков – TagGFP и TagRFP; используется как для FRET-, так и FLIM-технологий [70].

Ключевым моментом для исследования тканей *in vivo* является использование для возбуждения оранжевого – дальнекрасного света (590–740 нм), поскольку это наименее токсично для клеток [62]. Кроме того, при этих длинах волн компоненты живых клеток обладают наименьшим поглощением, рассеянием и автофлуоресценцией [71]. Таким образом, использование флуоресцентных белков со спектром эмиссии в красной области позволяет увеличить доступную для детекции глубину в тканях животных [72]. В то же время, в культуре клеток эта система позволяет работать в других спектральных диапазонах (синий, зеленый и желтый) для дополнительной визуализации других клеточных процессов. Это особенно важно в случае зеленой области спектра: существуют широкие панели химерных клеточных белков и сенсоров на основе GFP, а также стабильных клеточных линий и трансгенных организмов, экспрессирующих ген GFP. Например, каспазный сенсор на основе красных флуоресцентных белков dKeima570 и FP615 позволяет параллельно использовать сенсор на ионы кальция, состоящий из цианового и желтого белков [73].

Другой сенсор основан на еще более длинноволновых белках: донор – TagRFP (максимум возбуждения – 555 нм), акцептор – практически не флуоресцирующий до фотоактивации белок KFP (Kindling Fluorescent Protein) [74, 75]. Для детекции FRET использовали метод FLIM, отслеживая изменение времени жизни флуоресценции донора TagRFP, в том числе на моделях опухолей мышей *in vivo* [76]. Применение обычной флуоресцентной микроскопии в данном случае за-

труднительно, поскольку отсутствует внутренний контроль, на который необходимо нормировать сигнал от донора.

Недавно был сконструирован сенсор mKate2-DEVD-iRFP на основе FRET между дальнекрасным флуоресцентным белком mKate2 в качестве донора и ближнеинфракрасным флуоресцентным белком iRFP в качестве акцептора [77]. С помощью данного сенсора активацию каспазы-3 можно детектировать как по изменению отношения интенсивностей дальнекрасной и ближнеинфракрасной флуоресценции, так и по увеличению времени жизни флуоресценции mKate2. Свободный зеленый канал детекции позволил провести в индивидуальных клетках одновременную регистрацию активации каспазы-3 и транслокации белка Bax-EGFP из цитоплазмы в митохондрии в процессе апоптоза. К недостаткам данного сенсора можно отнести низкую яркость флуоресценции iRFP и невысокий динамический диапазон изменения сигнала (около 1.6 раза).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Каспазы играют важную роль в программируемой клеточной гибели и некоторых других процессах. Интерес исследователей к этой области привел к созданию множества сенсоров на самых разных принципах регистрации. Особый интерес представляют внутриклеточные сенсоры, поскольку они дают возможность визуализации активации каспаз в живых системах. Сенсоры различного дизайна имеют определенные преимущества и недостатки, которые необходимо учитывать при выборе сенсора для изучаемой конкретной биологической системы. Так, генетически кодируемые сенсоры на основе флуоресцентных белков дают возможность регистрации активации каспаз на уровне единичных живых клеток. Сенсоры на основе сплит-вариантов флуоресцентных белков имеют высокий динамический диапазон, но несколько отложенный во времени ответ, а FRET-сенсоры имеют преимущества радиометрического и FLIM-сигнала и быстрого ответа в режиме реального времени.

Использование биолюминесцентных сенсоров позволяет избежать фототоксических эффектов, а также дает гораздо более высокую чувствительность по сравнению с флуоресцентными сенсорами на уровне целых организмов *in vivo*. Вместе с тем, биолюминесцентные сенсоры требуют специализированных высокочувствительных микроскопов для визуализации единичных клеток, а также нуждаются в добавлении люциферина, что существенно удорожает анализ и вводит дополнительные искажения за счет доставки и расхода субстрата. Возможно, новые биолюминесцентные системы и расшифровка

механизмов биосинтеза люциферинов [41, 78–81] помогут решить эти проблемы в будущем.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Alnemri E.S., Livingston D.J., Nicholson D.W., Salvesen G., Thornberry N.A., Wong W.W., Yuan J.* // *Cell*. 1996. V. 87. P. 171.
2. *Los M., Van de Craen M., Penning L.C., Schenk H., Westendorp M., Baeuerle P.A., Dröge W., Krammer P.H., Fiers W., Schulze-Osthoff K.* // *Nature*. 1995. V. 375. P. 81–83.
3. *Belema-Bedada F., Uchida S., Martire A., Kostin S., Braun T.* // *Cell Stem Cell*. 2008. V. 2. P. 566–575.
4. *Janzen V., Fleming H.E., Riedt T., Karlsson G., Riese M.J., Lo Celso C., Reynolds G., Milne C.D., Paige C.J., Karlsson S., Woo M., Scadden D.T.* // *Cell Stem Cell*. 2008. V. 2. P. 584–594.
5. *Shalini S., Dorstyn L., Dawar S., Kumar S.* // *Cell Death Differ*. 2015. V. 22. P. 526–539.
6. *Wu C.C., Lee S., Malladi S., Chen M.D., Mastrandrea N.J., Zhang Z., Bratton S.B.* // *Nat. Commun*. 2016. V. 7. P. 13565.
7. *Dorstyn L., Akey C.W., Kumar S.* // *Cell Death Differ*. 2018. *Cell Death Differ*. 2018. V. 25. P. 1194–1208.
8. *Li J., Figueira S.K., Vrazo A.C.A., Binkowski B.F., Butler B.L., Tabata Y., Filipovich A., Jordan M.B., Risma K.A.* // *J. Immunol*. 2014. V. 193. P. 519–528.
9. *Juraver-Geslin H.A., Durand B.C.* // *Genesis*. 2015. V. 53. P. 203–224.
10. *Engels I.H., Totzke G., Fischer U., Schulze-Osthoff K., Jänicke R.U.* // *Mol. Cell. Biol*. 2005. V. 25. P. 2808–2818.
11. *Zhao Y., Lei M., Wang Z., Qiao G., Yang T., Zhang J.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2014. V. 450. P. 526–531.
12. *Slee E.A., Adrain C., Martin S.J.* // *J. Biol. Chem*. 2001. V. 276. P. 7320–7326.
13. *Walsh J.G., Cullen S.P., Sheridan C., Lüthi A.U., Gerner C., Martin S.J.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008. V. 105. P. 12815–12819.
14. *Martynova E.A.* // *Bioorg. Khim*. 2003. V. 29. P. 518–543.
15. *Wall D.M., McCormick B.A.* // *Cell. Microbiol*. 2014. V. 16. P. 1746–1756.
16. *Chen H., Yang X., Feng Z., Tang R., Ren F., Wei K., Chen G.* // *Int. J. Clin. Exp. Med*. 2015. V. 8. P. 10225–10234.
17. *Gulyaeva N.V.* // *Zh. Vyssh. Nerv.Deiat.Im. I P Pavlova* 2004. V. 54. P. 437–447.
18. *Li Z., Jo J., Jia J.-M., Lo S.-C., Whitcomb D.J., Jiao S., Cho K., Sheng M.* // *Cell*. 2010. V. 141. P. 859–871.
19. *Huesmann G.R., Clayton D.F.* // *Neuron*. 2006. V. 52. P. 1061–1072.
20. *Dash P.K., Blum S., Moore A.N.* // *Neuroreport*. 2000. V. 11. P. 2811–2816.
21. *Stepanichev M.Y., Kudryashova I.V., Yakovlev A.A., Onufriev M.V., Khaspekov L.G., Lyzhin A.A., Lazareva N.A., Gulyaeva N.V.* // *Neuroscience*. 2005. V. 136. P. 579–591.
22. *Zhao X., Wang D., Zhao Z., Xiao Y., Sengupta S., Xiao Y., Zhang R., Lauber K., Wesselborg S., Feng L., Rose T.M., Shen Y., Zhang J., Prestwich G., Xu Y.* // *J. Biol. Chem*. 2006. V. 281. P. 29357–29368.
23. *Laplante P., Sirois I., Raymond M.-A., Kokta V., Béliveau A., Prat A., Pshezhetsky A.V., Hébert M.-J.* // *Cell Death Differ*. 2010. V. 17. P. 291–303.
24. *Bonner C., Bacon S., Concannon C.G., Rizvi S.R., Baquié M., Farrelly A.M., Kilbride S.M., Dussmann H., Ward M.W., Boulanger C.M., Wollheim C.B., Graf R., Byrne M.M., Prehn J.H.M.* // *Diabetes*. 2010. V. 59. P. 2799–2808.
25. *Huang Q., Li F., Liu X., Li W., Shi W., Liu F.-F., O'Sullivan B., He Z., Peng Y., Tan A.-C., Zhou L., Shen J., Han G., Wang X.-J., Thorburn J., Thorburn A., Jimeno A., Raben D., Bedford J.S., Li C.-Y.* // *Nat. Med*. 2011. V. 17. P. 860–866.
26. *McStay G.P., Salvesen G.S., Green D.R.* // *Cell Death Differ*. 2008. V. 15. P. 322–331.
27. *Kosaihiro A., Ona T.* // *Anal. Bioanal.Chem*. 2008. V. 391. P. 1889–1897.
28. *Park K., Ahn J., Yi S.Y., Kim M., Chung B.H.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2008. V. 368. P. 684–689.
29. *Chen H., Mei Q., Hou Y., Zhu X., Koh K., Li X., Li G.* // *Analyst*. 2013. V. 138. P. 5757–5761.
30. *Zhou S., Zheng T., Chen Y., Zhang J., Li L., Lu F., Zhu J.-J.* // *Biosens. Bioelectron*. 2014. V. 61. P. 648–654.
31. *Kumaraswamy S., Bergstedt T., Shi X., Rininsland F., Kushon S., Xia W., Ley K., Achyuthan K., McBranch D., Whitten D.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004. V. 101. P. 7511–7515.
32. *Boeneman K., Mei B.C., Dennis A.M., Bao G., Deschamps J.R., Mattoussi H., Medintz I.L.* // *J. Am. Chem. Soc*. 2009. V. 131. P. 3828–3829.
33. *Prasuhn D.E., Feltz A., Blanco-Canosa J.B., Susumu K., Stewart M.H., Mei B.C., Yakovlev A.V., Loukov C., Mallet J.-M., Oheim M., Dawson P.E., Medintz I.L.* // *ACS Nano*. 2010. V. 4. P. 5487–5497.
34. *Goryashchenko A.S., Khrenova M.G., Bochkova A.A., Ivashina T.V., Vinokurov L.M., Savitsky A.P.* // *Int. J. Mol. Sci*. 2015. V. 16. P. 16642–16654.
35. *Berezin M.Y., Achilefu S.* // *Chem. Rev*. 2010. V. 110. P. 2641–2684.
36. *Kang H.J., Kim J.H., Chung S.J.* // *Biosens. Bioelectron*. 2015. V. 67. P. 413–418.
37. *Yuan Y., Kwok R.T.K., Tang B.Z., Liu B.* // *J. Amer. Chem. Soc*. 2014. V. 136. P. 2546–2554.
38. *Stefflova K., Chen J., Marotta D., Li H., Zheng G.* // *J. Med. Chem*. 2006. V. 49. P. 3850–3856.
39. *Yan H., He L., Zhao W., Li J., Xiao Y., Yang R., Tan W.* // *Anal. Chem*. 2014. V. 86. P. 11440–11450.
40. *Wang H., Zhang Q., Chu X., Chen T., Ge J., Yu R.* // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. 2011. V. 50. P. 7065–7069.
41. *Kaskova Z.M., Tsarkova A.S., Yampolsky I.V.* // *Chem. Soc. Rev*. 2016. V. 45. P. 6048–6077.



42. Coppola J.M., Ross B.D., Rehemtulla A. // Clin. Cancer Res. 2008. V. 14. P. 2492–2501.
43. Lee H.W., Singh T.D., Lee S.-W., Ha J.-H., Rehemtulla A., Ahn B.-C., Jeon Y.H., Lee J. // FASEB J. 2014. V. 28. P. 2932–2941.
44. Shekhawat S.S., Porter J.R., Sriprasad A., Ghosh I. // J. Am. Chem. Soc. 2009. V. 131. P. 15284–15290.
45. Dacres H., Dumancic M.M., Horne I., Trowell S.C. // Anal. Biochem. 2009. V. 385. P. 194–202.
46. den Hamer A., Dierickx P., Arts R., de Vries J.S.P.M., Brunsveld L., Merckx M. // ACS Sens 2017. V. 2. P. 729–734.
47. Chudakov D.M., Matz M.V., Lukyanov S., Lukyanov K.A. // Physiol. Rev. 2010. V. 90. P. 1103–1163.
48. Bardet P.-L., Kolahgar G., Mynett A., Miguel-Aliaga I., Briscoe J., Meier P., Vincent J.-P. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2008. V. 105. P. 13901–13905.
49. Werner J.M., Steinfeldt H.J. // J. Pharmacol. Toxicol. Methods 2008. V. 57. P. 131–137.
50. Vagner T., Mouravlev A., Young D. // J. Pharmacol. Toxicol. Methods 2015. V. 72. P. 11–18.
51. Zhang J., Wang X., Cui W., Wang W., Zhang H., Liu L., Zhang Z., Li Z., Ying G., Zhang N., Li B. // Nat. Commun. 2013. V. 4. P. 2157.
52. To T.-L., Piggott B.J., Makhijani K., Yu D., Jan Y.N., Shu X. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2015. V. 112. P. 3338–3343.
53. To T.-L., Schepis A., Ruiz-González R., Zhang Q., Yu D., Dong Z., Coughlin S.R., Shu X. // Cell Chem. Biol. 2016. V. 23. P. 875–882.
54. Xie J., Wang C., Virostko J., Manning H.C., Pham W., Bauer J., Gore J.C. // ChemBiochem. 2013. V. 14. P. 1494–1503.
55. Bajar B.T., Wang E.S., Zhang S., Lin M.Z., Chu J. // Sensors 2016. V. 16. P. 1488.
56. Pietraszewska-Bogiel A., Gadella T.W.J. // J. Microsc. 2011. V. 241. P. 111–118.
57. Carlson H.J., Campbell R.E. // Curr. Opin. Biotechnol. 2009. V. 20. P. 19–27.
58. Campbell R.E. // Anal. Chem. 2009. V. 81. P. 5972–5979.
59. van Munster E.B., Gadella T.W.J. // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2005. V. 95. P. 143–175.
60. Xu X., Gerard A.L., Huang B.C., Anderson D.C., Payan D.G., Luo Y. // Nucleic Acids Res. 1998. V. 26. P. 2034–2035.
61. Ge J., Wood D.K., Weingeist D.M., Prasongtanakij S., Navasumrit P., Ruchirawat M., Engelward B.P. // Cytometry A. 2013. V. 83. P. 552–560.
62. Wäldchen S., Lehmann J., Klein T., van de Linde S., Sauer M. // Sci. Rep. 2015. V. 5. P. 15348.
63. Luo K.Q., Yu V.C., Pu Y., Chang D.C. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001. V. 283. P. 1054–1060.
64. Angres B., Steuer H., Weber P., Wagner M., Schneckenburger H. // Cytometry A. 2009. V. 75. P. 420–427.
65. Kominami K., Nagai T., Sawasaki T., Tsujimura Y., Yashima K., Sunaga Y., Tsuchimochi M., Nishimura J., Chiba K., Nakabayashi J., Koyamada K., Endo Y., Yokota H., Miyawaki A., Manabe N., Sakamaki K. // PLoS One. 2012. V. 7. P. e50218.
66. Sha S., Jin H., Li X., Yang J., Ai R., Lu J. // Protein Cell. 2012. V. 3. P. 392–399.
67. Kohl T., Schwille P. // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2005. V. 95. P. 107–142.
68. Keese M., Offterdinger M., Tischer C., Girod A., Lommerse P.H.M., Yagublu V., Magdeburg R., Bastiaens P.I.H. // Differentiation. 2007. V. 75. P. 809–818.
69. Keese M., Yagublu V., Schwenke K., Post S., Bastiaens P. // Int. J. Cancer. 2010. V. 126. P. 104–113.
70. Shcherbo D., Souslova E.A., Goedhart J., Chepurnykh T.V., Gaintzeva A., Shemiakina I.I., Gadella T.W.J., Lukyanov S., Chudakov D.M. // BMC Biotechnol. 2009. V. 9. P. 24.
71. Weissleder R., Ntziachristos V. // Nat. Med. 2003. V. 9. P. 123–128.
72. Li I.T., Pham E., Truong K. // Biotechnol. Lett. 2006. V. 28. P. 1971–1982.
73. Miyamoto A., Miyauchi H., Kogure T., Miyawaki A., Michikawa T., Mikoshiba K. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2015. V. 460. P. 82–87.
74. Rusanov A.L., Ivashina T.V., Vinokurov L.M., Fiks I.I., Orlova A.G., Turchin I.V., Meerovich I.G., Zherdeva V.V., Savitsky A.P. // J. Biophotonics 2010. V. 3. P. 774–783.
75. Savitsky A.P., Rusanov A.L., Zherdeva V.V., Gorodnicheva T.V., Khrenova M.G., Nemukhin A.V. // Theranostics. 2012. V. 2. P. 215–226.
76. Zherdeva V., Kazachkina N.I., Shcheslavskiy V., Savitsky A.P. // J. Biomed. Opt. 2018. V. 23(3). P. 1–11.
77. Zlobovskaya O.A., Sergeeva T.F., Shirmanova M.V., Dudenkova V.V., Sharonov G.V., Zagaynova E.V., Lukyanov K.A. // Biotechniques. 2016. V. 60. P. 62–68.
78. Dubinnyi M.A., Kaskova Z.M., Rodionova N.S., Baranov M.S., Gorokhovatsky A.Y., Kotlobay A., Solntsev K.M., Tsarkova A.S., Petushkov V.N., Yampolsky I.V. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2015. V. 54. P. 7065–7067.
79. Purtov K.V., Petushkov V.N., Baranov M.S., Mineev K.S., Rodionova N.S., Kaskova Z.M., Tsarkova A.S., Petunin A.I., Bondar V.S., Rodicheva E.K., Medvedeva S.E., Oba Y., Oba Y., Arseniev A.S., Lukyanov S., Gitelson J.I., Yampolsky I.V. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2015. V. 54. P. 8124–8128.
80. Kaskova Z.M., Dörr F.A., Petushkov V.N., Purtov K.V., Tsarkova A.S., Rodionova N.S., Mineev K.S., Guglya E.B., Kotlobay A., Baleeva N.S., Baranov M.S., Arseniev A.S., Gitelson J.I., Lukyanov S., Suzuki Y., Kanie S., Pinto E., Di Mascio P., Waldenmaier H.E., Pereira T.A., Carvalho R.P., Oliveira A.G., Oba Y., Bastos E.L., Stevani C.V., Yampolsky I.V. // Sci. Adv. 2017. V. 3. P. e1602847.
81. Oba Y., Suzuki Y., Martins G.N.R., Carvalho R.P., Pereira T.A., Waldenmaier H.E., Kanie S., Naito M., Oliveira A.G., Dörr F.A., Pinto E., Yampolsky I.V., Stevani C.V. // Photochem. Photobiol. Sci. 2017. V. 16. P. 1435–1440.

## Sensors for Caspase Activities

**O. A. Zlobovskaya\***, **M. V. Shirmanova\*\***, **T. F. Kovaleva\*\***, **K. S. Sarkisyan\***,  
**E. V. Zagaynova\*\***, and **K. A. Lukyanov\***, \*\*, #

\**Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, 117997 Moscow, Russia*

\*\**Privolzhskiy Research Medical University, 10/1 pl. Minina and Pozharskogo, 603005 Nizhny Novgorod, Russia*

Cysteine proteinase caspases play an important role in programmed cell death. In apoptosis, regardless of initial stimulus, signaling pathways cross on effector caspases; caspase-3 appears to be a key player among them. In the present review, we consider sensors for activity of caspase-3 and some other caspases. For the last ten years, it was created a variety of such sensors based on very different detection principles, fluorescence and luminescence being the most popular ones. Intracellular sensors that enable visualization of caspase activity in living systems are of a special interest. We briefly describe advantages and shortcomings of sensors of various design, which should be taken into account when choosing a sensor for a particular experimental model.

*Keywords: caspase, apoptosis, sensor, Forster resonance energy transfer, fluorescent protein, luciferase*