



УДК 577.24

ИДЕНТИФИКАЦИЯ НОВОГО МАКРОМОЛЕКУЛЯРНОГО КОМПЛЕКСА АКТИВАЦИИ КАСПАЗЫ-2 ПРИ ПОВРЕЖДЕНИЯХ ДНК

© 2016 г. Г. С. Копейна^{*, +}, А. В. Замираев^{*, +}, Б. Д. Животовский^{*, **, #}, И. Н. Лаврик^{*, ***, #}

^{*}Факультет фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, 119192, Россия, Москва, Ломоносовский пр., д. 31, корп. 5

^{**}Институт медицины окружающей среды, Каролинский институт, 17177, Стокгольм, Швеция

^{***}Институт экспериментальной медицины, университет им. Отто фон Герике, 39120, Магдебург, Германия

Поступила в редакцию 10.05.2015 г. Принята к печати 15.08.2015

Каспаза-2 выполняет инициаторные функции при запуске апоптоза в ответ на повреждение ДНК в клетках. В работе изучен механизм активации инициаторной каспазы-2 в клетках линии карциномы яичника человека в ответ на их обработку ДНК-повреждающим химиотерапевтическим агентом цисплатином. Для идентификации макромолекулярного комплекса, в составе которого каспаза-2 активируется, разработан метод, основанный на комбинации гель-фильтрации и иммунопреципитации, первый этап которого позволяет отделить мономерную проформу белка от высокомолекулярного комплекса, а второй – выделить данный комплекс из высокомолекулярных фракций после проведения гель-фильтрации. Анализ полученного комплекса показал, что белок RAIDD, один из компонентов известной из литературы платформы активации каспазы-2 (PIDosome), не взаимодействует с выделенной из высокомолекулярных фракций каспазой-2, и, следовательно, по всей вероятности, не входит в состав макромолекулярного комплекса активации фермента в исследуемой экспериментальной модели. Анализ ферментативной активности образцов иммунопреципитации подтвердил наличие активированной формы каспазы-2 в полученном высокомолекулярном комплексе.

Ключевые слова: апоптоз, каспаза-2, высокомолекулярный инициаторный комплекс, карцинома яичника.

DOI: 10.7868/S0132342316010061

ВВЕДЕНИЕ

Апоптоз – один из видов программируемой клеточной гибели – это присущая всем многокле-

точным организмам цепь событий, которая отвечает за процессы морфогенеза, корректного функционирования различных органов, а также обеспечивает удаление поврежденных либо выполнивших свои функции клеток [1]. Основными ферментами, участвующими в инициации апоптоза и его дальнейшем протекании, являются белки семейства цистеиновых протеаз – каспазы, которые существуют в клетке в неактивной форме [2]. При поступлении сигнала запуска апоптоза происходит образование ряда белковых комплексов, в составе которых осуществляется процессинг и активация инициаторных каспаз (каспазы-2, -8, -9, -10). Они в свою очередь расщепляют и активируют эффекторные цистеиновые протеазы (каспазы-3, -6, -7), что, собственно, и приводит к реализации программируемой гибели клетки [3]. Изучение молекулярных платформ, активирующих ферменты запуска апоптоза, требует системного подхода для идентификации белковых компонентов и подтверждения их роли в процессе активации каспаз. Поскольку каспазный каскад является ключевым механизмом апоптоза, выявление его неизвестных ранее участников позволяет получить новые сведения о процессе программируемой гибели и глубже понять принципы возникновения болезней, связанных с нарушениями апоптотического процесса, в том числе онкологических заболева-

⁺ Данные авторы принимали равное участие в выполнении исследования.

Сокращения: AIF – белок, индуцирующий апоптоз (apoptosis-inducing factor); AMC – 7-амино-4-метилкумарин; CARD – домен, обеспечивающий гомотипическое связывание каспаз между собой и с другими белками (Caspase-Recruitment Domain); DISC – сигнальный комплекс, индуцирующий клеточную гибель (Death-Inducing Signaling Complex); ECL – усиленный хемилюминесцентный субстрат, содержащий люминол (enhanced luminol-based chemiluminescent substrate); FACS – сортировка клеток с активированной флуоресценцией (Fluorescence Activated Cell Sorting); FITC – флуоресцеинизотиоцианат; GAPDH – глицеральгид-3-фосфат-дегидрогеназа; HMW, LMW и MMW – высокомолекулярная, низкомолекулярная и средномолекулярная фракции при гель-фильтрации; PARP – поли(ADP-рибозо)полимераза 1 (PolyADP-Ribose Polymerase 1); PBS – фосфатный солевой буфер; PID – p53-активируемый белок, содержащий домен смерти (p53-inducible death domain-containing protein); PMSF – фенилметилсульфонилфторид; RAIDD – RIP-ассоциированный гомолог ICH-1, содержащий домен смерти (RIP-associated ICH-1 homologous protein with a death domain); RIP – белок, взаимодействующий с рецептором (receptor-interacting protein); shRNA – малая РНК, образующая шпильки (small hairpin RNA); siRNA – малая интерферирующая РНК (small interference RNA); ИП – иммунопреципитация; ПААГ – полиакриламидный гель; ПИ – йодид пропидия; ПЦ – проточная цитометрия.

[#] Автор для связи (тел.: +7 (495) 932-98-30, эл. почта: ilav3103@gmail.com).

ний. Исследование макромолекулярных инициаторных комплексов ведется на протяжении двух последних десятилетий, при этом достаточно полная характеристика того или иного комплекса требует значительного времени [4]. Так, например, комплекс DISC (Death-inducing signaling complex), активирующий прокаспазы-8/-10, был впервые описан в 1995 году, однако его стехиометрия была определена только в 2012 году [5].

Процессы программируемой гибели клеток напрямую зависят от образования таких инициаторных комплексов, как DISC, апоптосома, некросома или рипоптосома [6]. Однако выделение данных платформ активации — одна из самых трудоемких задач в биохимии и молекулярной биологии, поскольку в ходе получения комплекса белки, его формирующие, могут агрегировать, терять нативную конформацию или подвергаться неспецифическому расщеплению. Выделение комплексов, активирующих каспазы, также осложняется тем, что такие молекулярные платформы образуются в клетке в небольшом количестве и могут достаточно быстро деградировать. Кроме того, нестабильное связывание белков-партнеров и диссоциация комплекса дополнительно затрудняют процедуру очистки. Таким образом, разработка подходов для получения функционально активных комплексов из клеток является приоритетным направлением в области исследований молекулярных механизмов программируемой гибели.

Индукция генотоксического стресса с помощью повреждений ДНК является одним из наиболее широко распространенных методов лечения онкологических заболеваний. Повреждения ДНК индуцируют в клетке ряд сигнальных каскадов, которые приводят к образованию апоптотических комплексов и активации инициаторных каспаз. Одной из важнейших инициаторных каспаз, играющих центральную роль в запуске ответа на генотоксический стресс, является каспаза-2 [7]. Проформа этой протеазы, включающей каталитические субъединицы p19 и p12, характеризуется наличием продомена, содержащего CARD-домен (caspase activation recruitment domain) и последовательность ядерной локализации (NLS). Несмотря на важнейшую роль каспазы-2, механизм ее активации до сих пор остается неизвестным.

В 2004 г. было показано, что активация каспазы-2 в ответ на повреждение ДНК происходит в составе комплекса PIDDosome, который включает также адапторный белок RAIDD и С-концевой фрагмент белка PIDD [8]. Белок RAIDD (RIP-ассоциированный гомолог ICH-1) содержит как домен смерти (DD-death domain), так и домен CARD, что позволяет ему играть центральную роль в сборке комплекса PIDDosome через гомотипические взаимодействия. При этом белок RAIDD взаимодействует

с С-концевым фрагментом белка PIDD через домен смерти и с прокаспазой-2 через домен CARD.

Позже появился целый ряд работ, в которых были собраны доказательства того, что каспаза-2 способна активироваться независимо как от белков PIDD и RAIDD, так и от сборки комплекса PIDDosome [9–12]. Необходимо отметить, что идентификация комплекса PIDDosome происходила в условиях повышенной экспрессии гена белка PIDD [8], при этом попытки получить этот комплекс в условиях обычной экспрессии не были успешными. С другой стороны, результаты исследований активации каспазы-2 не позволяли сделать вывод о самом PIDDosome-независимом механизме. Оставалось загадкой — происходил ли этот процесс в составе какой-либо высокомолекулярной платформы или же являлся следствием расщепления под действием другой инициаторной каспазы.

Целью настоящей работы явилось изучение механизма активации каспазы-2 в ответ на повреждение ДНК. Для решения поставленной задачи в качестве экспериментальной модели были использованы клетки линии карциномы яичника Саov-4 и химиотерапевтический ДНК-повреждающий агент цисплатин, поскольку согласно изучению мышей с выключенным геном каспазы-2 именно клетки яичников обладают устойчивостью к повреждениям ДНК [13]. В ходе выполнения работы был охарактеризован новый макромолекулярный комплекс активации каспазы-2 путем выделения его с помощью гель-фильтрации в сочетании с последующей иммунопреципитацией (ИП) и анализа каталитической активности данного фермента. Использование разработанного метода позволило установить, что каспаза-2 подвергается аутокаталитическому процессингу и активации в составе комплекса, не содержащего компонентов комплекса PIDDosome. Таким образом, использование нового подхода дало возможность впервые сделать вывод о формировании нового комплекса, альтернативного PIDDosome, в клетках карциномы яичника после повреждения ДНК.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Каспаза-2 играет центральную роль при индукции апоптоза в ответ на повреждение ДНК в клетках Саov-4

Для оценки роли каспазы-2 в индукции апоптоза под воздействием ДНК-повреждающего агента цисплатина был проведен анализ гибели опухолевых клеток карциномы яичника Саov-4 и клеток с пониженным уровнем экспрессии гена каспазы-2 Саov-4-shRNA-каспаза-2. Клетки Саov-4 были обработаны цисплатином в концентрациях 35, 70, 105, 150 и 250 мкМ в течение 48 ч. Аналогичным образом обрабатывали клетки Саov-4-shRNA-каспаза-2. Затем пробы были

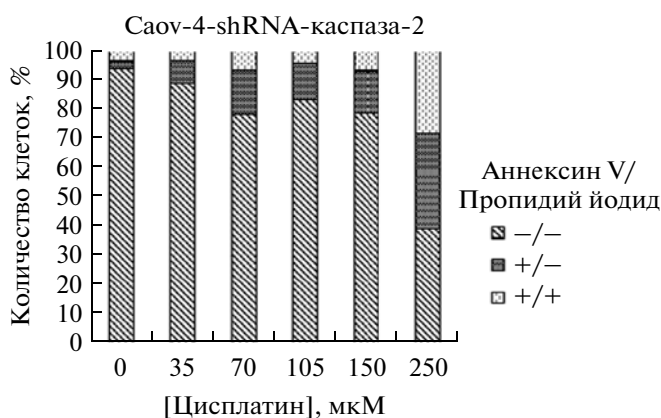
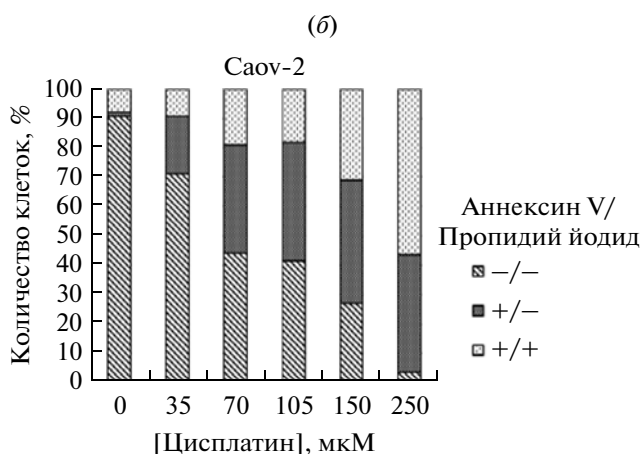
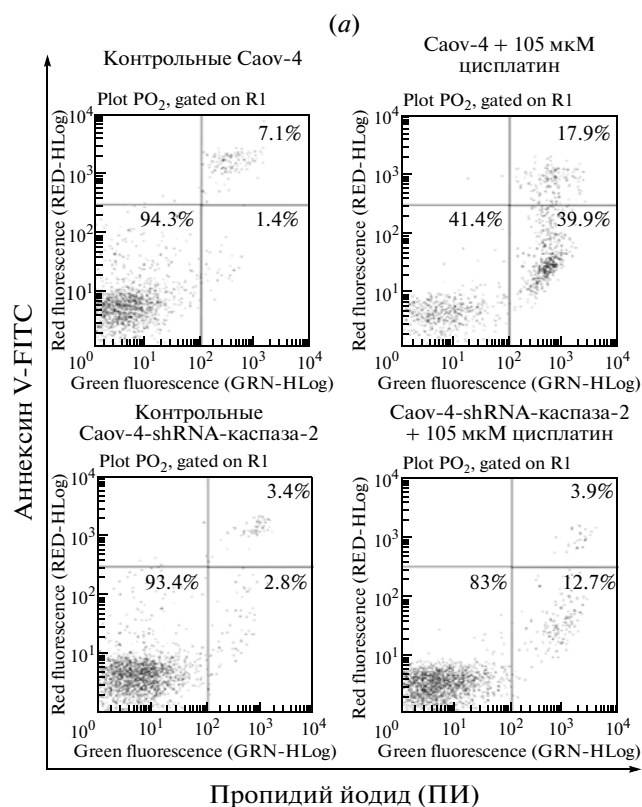


Рис. 1. Анализ методом проточной цитометрии клеток Caov-4 и Caov-4-shRNA-каспаза-2, обработанных цисплатином. Клетки были окрашены конъюгатом аннексин V-FITC и йодидом пропидия (ПИ). Обозначения для аннексин V/ПИ: -/- – жизнеспособные клетки; +/- – апоптотические клетки; +/+ – некротические клетки. (а) Данные ПЦ для контрольных и обработанных цисплатином клеток. (б) Гистограммы данных ПЦ для клеток, обработанных цисплатином в разных концентрациях.

окрашены аннексином V, конъюгированным с FITC, в комбинации с йодидом пропидия и проанализированы на проточном цитофлуориметре. С помощью такого двойного окрашивания проводили оценку популяции клеток, вступивших в апоптоз или вторичный некроз (рис. 1а). При этом в качестве ранней апоптотической популяции рассматривали клетки, которые были окрашены только аннексином V, а к популяции некротических клеток относили клетки, которые демонстрировали двойное окрашивание (рис. 1а). Данные проточной цитометрии (ПЦ) свидетельствуют о том, что обработка цисплатином клеток Caov-4 вызывает заметное увеличение количества погибших клеток, при этом повышение концентрации цисплатина от 35 до 70 мкМ приводит к существенному возрастанию уровня апоптотической смерти – с 19 до 36% (рис. 1б). Однако дальнейшее увеличение концентрации индуктора приводит к росту не апоптотической, а некротической популяции, поэтому в последующих экспериментах был использован цисплатин в концентрации 70 мкМ.

При обработке цисплатином клеток Caov-4-shRNA-каспаза-2 наблюдалось заметное снижение уровня гибели клеток по сравнению с клетками Caov-4 (рис. 1б). Сравнение уровней апоптоза в клетках Caov-4 и клетках Caov-4 с пониженной экспрессией каспазы-2 подтверждает центральную роль каспазы-2 в разворачивании процесса программируемой гибели в ответ на генотоксический стресс.

Активация каспазы-2 в ответ на воздействие цисплатина

Для определения времени активации каспазы-2 был исследован процессинг профермента в ответ на обработку клеток цисплатином. Клетки обрабатывали ДНК-повреждающим агентом в течение разных промежутков времени (от 2 до 24 ч), после чего их лизировали и проводили анализ расщепления прокаспазы-2 с помощью Вестерн-блота (рис. 2). Показано, что увеличение количества продукта расщепления прокаспазы-2 – фрагмента 32 кДа (p32) – начинается после 2 ч инкубации с цисплатином, а к 18 ч появляется заметное количество большой каталитической субъединицы с молекулярной массой 19 кДа (p19). Максимальное количество данного

фрагмента детектируется через 24 ч обработки индуктором апоптоза (рис. 2). Следует отметить, что под действием цисплатина происходит также расщепление белка PARP, который является субстратом эффекторных каспаз [14].

Данные результаты подтверждают реализацию процессов активации каспазы-2 и запуска апоптотических процессов в линиях опухолевых клеток карциномы яичника Саov-4 в ответ на повреждение ДНК, вызванное обработкой химиотерапевтическим агентом. На основании полученных результатов было принято решение о выделении комплекса активации каспазы-2. Для выделения комплекса была выбрана временная точка 18 ч после индукции апоптоза (рис. 2), поскольку в течение этого времени в клетках активно протекают инициаторные процессы программируемой клеточной смерти и, вполне вероятно, образуется максимальное количество активирующего комплекса.

Выделение комплекса активации каспазы-2

Для исследования макромолекулярного комплекса активации каспазы-2 был разработан подход препаративного выделения высокомолекулярной фракции из контрольных и обработанных цисплатином клеток Саov-4 с помощью метода гель-фильтрации в комбинации с ИП. Использование носителя Superose 6 (GE Healthcare) позволило эффективно осуществить разделение высокомолекулярных (НМВ), средне- (ММВ) и низкомолекулярных (ЛМВ) белковых фракций (рис. 3). Было установлено, что каспаза-2 в НМВ-фракциях (700 кДа и выше) детектируется только в клетках, обработанных цисплатином, но не в контрольных. Более того, в высокомолекулярном комплексе были обнаружены продукты аутолитического расщепления каспазы-2, что свидетельствует о функциональной активности фермента в НМВ-фракции (рис. 3а). С другой стороны, применение сорбента Superose 6 позволило с большой эффективностью отделить комплекс от низкомолекулярных белковых компонентов клетки. На основании проведенных экспериментов сделан вывод о том, что под действием цисплатина в клетках происходит формирование высокомолекулярной белковой платформы, содержащей каспазу-2.

Введение этапа гель-фильтрации было необходимо, поскольку иммунопреципитация каспазы-2 из лизатов клеток, стимулированных цисплатином, приводила к копреципитации антителами, помимо активированной каспазы-2, также и проформы этого фермента. Вероятно, в ответ на повреждение ДНК в клетках образуется относительно невысокое количество комплекса активации каспазы-2, которого хватает для запуска программы гибели. Таким образом, использование гель-фильтрации для устранения конкурирующих мономерных форм каспазы-2, преобладаю-

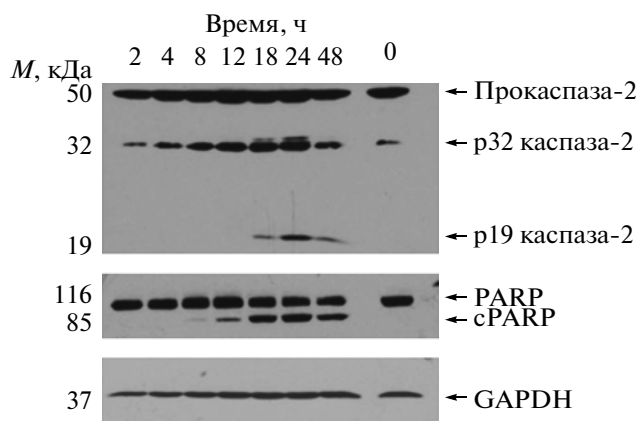


Рис. 2. Процессинг каспазы-2 и появление продукта расщепления PARP (сPARP) как маркера протекания апоптоза после обработки клеток 70 мкМ цисплатином (результаты Вестерн-блот). Показано время обработки клеток, 0 – контрольные клетки, не подвергавшиеся обработке. Стрелками показаны положение полос полноразмерных прокаспазы-2 и PARP, продуктов их протеолиза, а также маркера белковой загрузки геля – GAPDH (глицеральгид-3-фосфат-дегидрогеназа), слева – мол. массы белков в кДа.

щих в полных лизатах клеток, способствовало выделению высокомолекулярной платформы активации фермента.

Для анализа формирования комплекса активации каспазы-2 в различных временных точках была проведена гель-фильтрация лизатов клеток Саov-4, обработанных цисплатином в течение 6, 12, 18 и 24 ч. Вестерн-блот-анализ высокомолекулярных фракций показал, что наибольшее количество каспазы-2 детектируется во фракциях, полученных после 18 ч инкубации клеток с индуктором клеточной гибели (рис. 3б). Таким образом, полученные данные подтверждают результат предыдущих экспериментов по анализу кинетики процессинга каспазы-2 и свидетельствуют о том, что, по видимому, образование комплекса активации происходит после 18 ч инкубации.

Для дальнейшей очистки и характеристики исследуемого макромолекулярного комплекса была проведена иммунопреципитация (ИП) антителами против каспазы-2 с последующим анализом с помощью Вестерн-блота (рис. 4). В частности, большой интерес представлял анализ наличия компонентов платформы PIDDosome в данном комплексе. Результаты показали, что с помощью разработанного подхода каспаза-2 была успешно выделена в составе высокомолекулярного комплекса. Интересно, что ключевой компонент комплекса PIDDosome – адапторный белок RAIDD – не был детектирован не только в НМВ-фракции, но и ни в одном из образцов после ИП (рис. 4).

Согласно литературным данным, соотношение каспазы-2 и белка RAIDD в комплексе

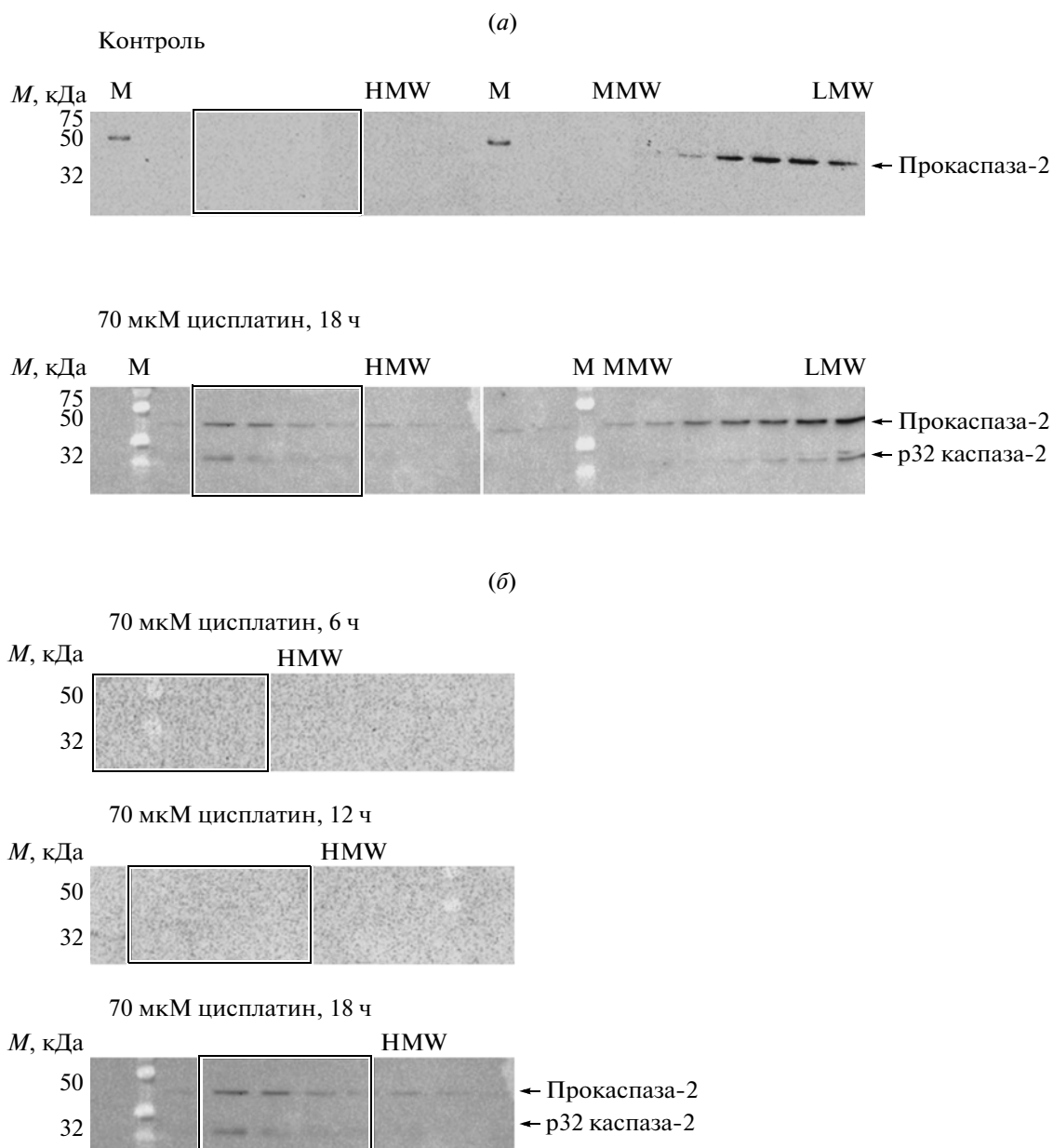


Рис. 3. Анализ образования макромолекулярного комплекса активации каспазы-2 с помощью гель-фильтрации. (а) Распределение каспазы-2 по фракциям после гель-фильтрации лизатов контрольных и обработанных цисплатином клеток. (б) Кинетика формирования высокомолекулярного комплекса, содержащего каспазу-2, в клетках, обработанных цисплатином в течение 6, 12 и 18 ч. Квадратом выделена HMW-фракция, содержащая комплекс активации каспазы-2. Стрелками показаны полосы полноразмерной прокаспазы-2 и продукта ее аутолитического расщепления – фрагмента p32. М – маркер молекулярных масс.

PIDDosome составляет 1 : 1 [15]. Необходимо отметить, что количество каспазы-2 в HMW-фракции было невелико, однако при проведении ИП происходило обогащение образца этим белком (рис. 4). При этом белок RAIDD не обнаруживался в тех же пробах, что свидетельствует в пользу его отсутствия в высокомолекулярном комплексе, содержащем каспазу-2. Следовательно, активация каспазы-2 в ответ на повреждения ДНК в данной модели происходила по PIDDosome-независимому пути. Таким

образом, был сделан вывод о том, что в клетках карциномы яичника в ответ на повреждения ДНК формируется новая альтернативная платформа, в составе которой каспаза-2 проходит процесс активации.

*Активация каспазы-2 не зависит
от формирования комплекса PIDDosome*

Для дополнительного подтверждения PIDDosome-независимой активации каспазы-2 были

проанализированы процессинг каспазы-2 и уровень гибели клеток Саov-4, обработанных siRNA (small interfering RNA) против белка RAIDD. Показано, что уровень апоптотической смерти клеток с пониженной экспрессией этого белка не отличался от контрольного (рис. 5а). Существенное снижение уровня RAIDD в клетках было продемонстрировано с помощью Вестерн-блота (рис. 5б). Показано, что несмотря на практически полное отсутствие RAIDD количество проформы каспазы-2 заметно уменьшается при обработке цисплатином клеток Саov-4, что свидетельствует о протекании аутокаталитического протеолиза и активации этой каспазы (рис. 5б). Кроме того, в клетках также наблюдается расщепление белка PARP, что подтверждает факт активации эффекторной каспазы-3 [16] (рис. 5б).

Таким образом, ингибирование синтеза RAIDD не приводило к появлению устойчивости клеток Саov-4 к повреждениям ДНК, что свидетельствует об отсутствии существенного вклада этого белка в механизм запуска апоптоза. Соответственно, в ходе работы было доказано, что в выбранной клеточной модели активация каспазы-2 и последующая апоптотическая гибель не зависят от описанного в литературе комплекса PIDDosome и происходят в составе альтернативной платформы.

Выделенный высокомолекулярный комплекс содержит функционально активную каспазу-2

Для оценки ферментативной активности каспазы-2 были проанализированы фракции, полученные гель-фильтрацией лизатов клеток и содержащие низкомолекулярные компоненты (10–55 кДа), белки и комплексы с промежуточной молекулярной массой (70–140 кДа) или высокомолекулярные комплексы (≥ 500 –700 кДа). В данных фракциях была измерена ферментативная активность каспазы-2 с помощью флуоресцентного производного пентапептида Ac-VDVAD-AMC [17]. Анализ пептидазной активности каспазы-2 показал, что уровни активности в низкомолекулярной и высокомолекулярной фракциях индуцированных клеток практически совпадали и превосходили уровень активности в среднеммолекулярных фракциях почти в 3 раза (рис. 6а). Таким образом, белки, обладающие ферментативной активностью по отношению к субстрату каспазы-2, детектировались не только в низкомолекулярных фракциях, где должны находиться мономеры каспазы-2, но и в высокомолекулярных, что подтверждало активацию каспазы-2 в составе высокомолекулярного комплекса. В отличие от обработанных цисплатином клеток в образцах, полученных из контрольных клеток, заметная ферментативная активность не была детектирована.

Для подтверждения функциональной активности высокомолекулярного комплекса каспазы-2

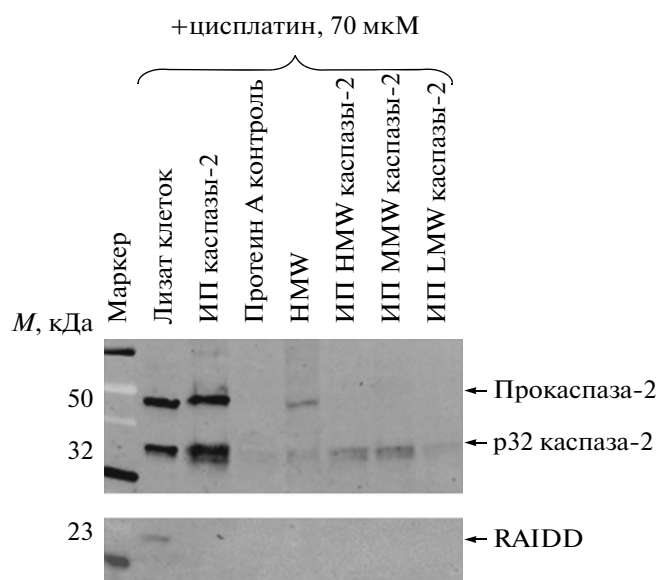


Рис. 4. Иммунопреципитация каспазы-2 из фракций с разной молекулярной массой. Фракции получены гель-фильтрацией лизатов клеток после 18 ч инкубации с 70 мкМ цисплатином. Стрелками показаны положения полос полноразмерной прокаспазы-2, продукта ее аутолитического расщепления – p32 и белка RAIDD. ИП – иммунопреципитация, HMW – высокомолекулярная фракция, MMW – среднеммолекулярная фракция, LMV – низкомолекулярная фракция.

из образцов ИП после гель-фильтрации были отобраны аликвоты для измерения каталитической активности каспазы-2 с помощью того же флуоресцентного субстрата. Сравнение пептидазной активности образцов после ИП из общего лизата, а также низко- и высокомолекулярных фракций показало, что в клетках, индуцированных цисплатином, наибольшей ферментативной активностью обладает HMW-фракция (рис. 6б). В контрольных клетках высокомолекулярный комплекс не был детектирован в гель-фильтрационном профиле каспазы-2, и, соответственно, ферментативной активности в образцах после ИП также не наблюдалось. Исследование каталитической активности выделенного комплекса в образцах ИП подтвердило наличие в его составе активной каспазы-2. Полученные результаты также свидетельствовали о том, что в случае повреждения ДНК в клетках происходит сборка высокомолекулярного комплекса, в составе которого осуществляется активация каспазы-2.

В литературе обсуждается модель активации инициаторных каспаз, основанная на факте сближения двух мономеров в комплексе, приводящего к конформационным перестройкам и процессингу этих протеаз [18, 19]. Вследствие того что каспаза-2 выступает в роли инициатора в процессе запуска апоптоза в ответ на повреждение ДНК, для нее может быть характерен аналогичный механизм активации. Полученные результа-

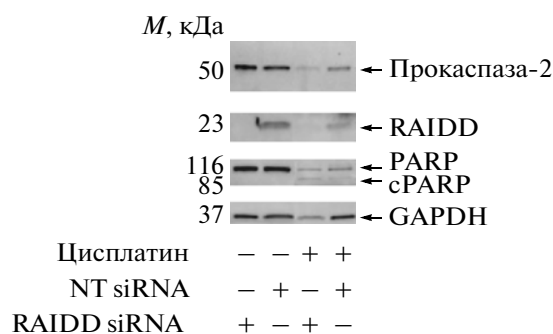
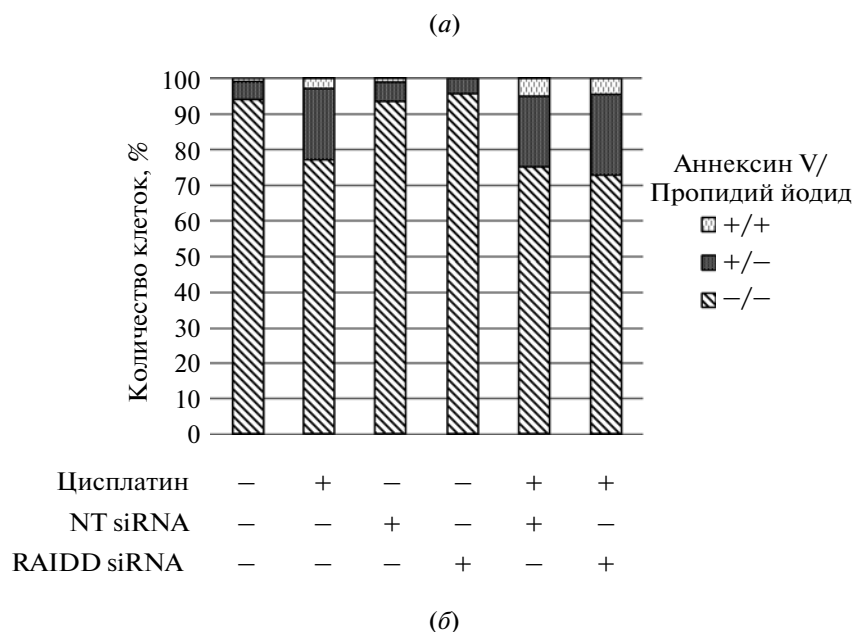


Рис. 5. Анализ роли белка RAIDD с помощью метода siRNA. Исследованы клетки Саov-4, обработанные контрольной siRNA (NT – no target) и siRNA против белка RAIDD, а также 70 мкМ цисплатином (в течение 24 ч). (а) Анализ методом проточной цитометрии. Обозначения окрашенных клеток см. в подписи к рис. 1. (б) Вестерн-блот анализ. Стрелками показаны положения полос полноразмерной прокаспазы-2, белков RAIDD и PARP и продукта протеолиза последнего – cPARP (cleaved PARP).

ты хорошо согласуются с данной моделью, поскольку сборка обнаруженного нами инициаторного комплекса, по-видимому, обеспечивает локальное увеличение концентрации каспазы-2 в клетке, что влечет за собой аутокаталитическое расщепление и формирование активного тетрамера.

Тест на каспазную активность продемонстрировал эффективность разработанного метода очистки, позволившего выделить высокомолекулярный комплекс активации каспазы-2. Отсутствие существенного уровня активности в образцах после ИП из полного лизата обработанных клеток или из низкомолекулярной фракции, вероятно, объяснялось тем, что в этом случае антитела против каспазы-2 взаимодействовали в первую очередь с неактивными мономерными формами каспазы-2. Необходимо отметить, что активация каспазы-2 зависит в первую очередь от

процесса димеризации, при этом даже димеризованная проформа способна проявлять частичную ферментативную активность [20]. Мономерные формы каспазы-2, в том числе и процессированный фрагмент р32, не проявляют ферментативной активности, если они не входят в состав гомо- или гетеродимера. Содержащаяся в НМW-фракциях каспаза-2, по-видимому, находилась преимущественно в димеризованной форме и обладала высокой энзиматической активностью, о чем свидетельствовал тот факт, что каспаза-2-подобная активность в этой фракции была практически равна таковой в LMW-фракции при весьма существенном различии в количестве самой каспазы-2 в пользу последней (рис. 3а и 6а).

При проведении ИП из НМW-фракций происходило обогащение образца, по-видимому, именно димеризованной каспазой-2, обладающей повышенной протеолитической активностью.

В LMW-фракциях, равно как и в полном лизате клеток, содержание мономерных неактивных форм, в том числе и процессированных, превосходило содержание димеризованных в несколько раз, что подтверждалось невысокой протеолитической активностью каспазы-2 в этих фракциях. Таким образом, по-видимому, при проведении ИП из LMW-фракций или полного лизата индуцированных клеток происходило обогащение образцов мономерными неактивными формами в силу их более высокого содержания в исследуемых пробах и большей стерической доступности.

Таким образом, в ходе проведенных исследований проанализирована роль каспазы-2 в индукции апоптоза в ответ на генотоксический стресс в клетках карциномы яичника. Кроме того, разработан подход для выделения макромолекулярного комплекса активации каспазы-2, и впервые напрямую продемонстрировано наличие в клетках карциномы яичника новой альтернативной платформы активации каспазы-2, которая образуется в ответ на повреждения ДНК. Проведенные исследования открывают новые перспективы в области изучения механизмов программируемой клеточной гибели, а также позволяют применить разработанный подход для изучения других высокомолекулярных сигнальных комплексов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование клеток

Исследования проведены на культурах клеток линий Saov-4 и Saov-4 shRNA ($-caspase-2$), любезно предоставленных отделением токсикологии Каролинского института (Стокгольм, Швеция). Клетки выращивали в CO_2 -инкубаторе (5% CO_2) при 37°C на среде DMEM, содержащей 10% телячьей сыворотки, в присутствии смеси антибиотиков и антимикотиков Antibiotic-Antimycotic (Gibco, США). Для экспериментов использовали клетки в логарифмической фазе роста.

FACS-анализ

Клетки в чашках Петри инкубировали в присутствии цисплатина (ТЕВА, Израиль) в концентрациях 35, 70, 105, 150, 250 мкМ в течение 24 и 48 ч, после этого снимали клетки с помощью 0.05% раствора трипсин-EDTA (Gibco, США) и переносили в кондиционированную среду. Клетки центрифугировали (2000 об/мин, 5 мин, 4°C), дважды промывали холодным раствором PBS (Панэко, Россия). Затем клетки (0.2×10^6) ресуспендировали в 200 мкл аннексинсвязывающего буфера (BD Biosciences, США), добавляли 2 мкл аннексин V – FITC (Invitrogen, США) и инкубировали в темном месте при 4°C в течение 15 мин. Далее к пробам добавляли 5 мкл йодида пропидия (50 мкг/мл) (BD Biosciences, США). После 5 мин инкубации в темном месте при комнатной температуре популяцию

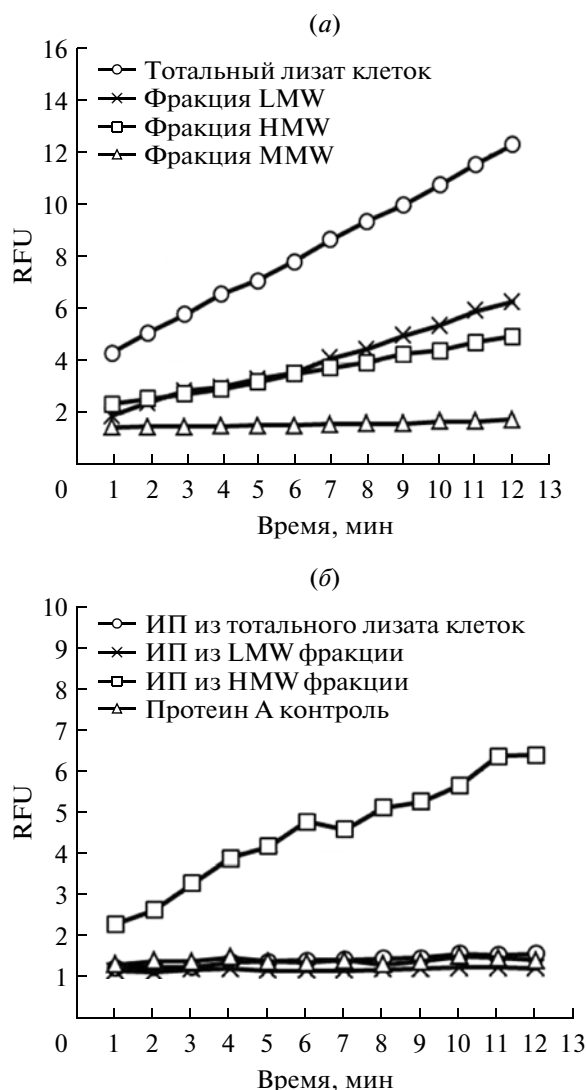


Рис. 6. Анализ пептидазной активности каспазы-2 в составе высокомолекулярного комплекса (субстрат – Ac-VDVAD-AMC). (а) Активность каспазы-2 в тотальном лизате клеток Saov-4, обработанных цисплатином, и в его фракциях LMW, MMW и HMW, полученных с помощью гель-фильтрации. (б) Активность каспазы-2 в образцах, полученных иммунопреципитацией лизата клеток Saov-4 и фракций, представленных на рис. 6а. Протеин А-контроль демонстрирует уровень неспецифической сорбции каспазы-2 на носителе протеин-А-сефарозе. RFU – относительные единицы флуоресцентной активности.

апоптотических клеток анализировали с помощью проточного цитофлуориметра Guava® easy-Cyte™ 8HT (Merck Millipore, Германия).

Анализ кинетики активации каспазы-2

Клетки в чашке Петри инкубировали в присутствии цисплатина (70 мкМ) в течение 2, 4, 8, 12, 18, 24 и 48 ч. Затем клетки снимали с чашек, отмывали в холодном растворе PBS и инкубировали на льду в течение 20 мин в 200 мкл лизирующего

буфера (20 мМ Tris-HCl (pH 7.4), 137 мМ NaCl, 10% SDS, 5% дезоксихолат натрия, 1% Triton X-100, 1% PMSF, коктейль ингибиторов протеаз Complete (Roche, Германия)). После центрифугирования (14000 об/мин, 15 мин, 4°C) часть супернатанта отбирали для определения количества белка в лизатах по методу Бредфорд, а другую часть анализировали с помощью Вестерн-блота.

Гель-электрофорез и вестерн-блоттинг белков

Образцы после добавления буфера для нанесения нагревали при 95°C в течение 5 мин, подвергали электрофорезу в 12% ПААГ в присутствии SDS и переносили на нитроцеллюлозную мембрану с помощью аппарата для вестерн-блоттинга (Bio-Rad, США). Затем мембрану переносили в 5% раствор обезжиренного молока в PBS, после чего трижды в течение 10 мин отмывали в растворе PBS. Далее мембрану инкубировали с первичными антителами против каспазы-2 (Santa Cruz Biotechnology, США), белка PARP (BD Transduction Lab, США) или против белка RAIDD (MBL International Corporation, США) в течение 12 ч при 4°C. После трех серий промывок в PBS, содержащем 0.05% Tween 20, мембрану инкубировали с вторичными антителами в течение 1 ч, отмывали 4 раза в том же растворе и проявляли с помощью ECL (Promega, США) на приборе Molecular Imager®ChemiDoc™ (Bio-Rad, США).

Гель-фильтрация

Контрольные клетки (~50 × 10⁶) трижды отмывали от среды в холодном растворе PBS, снимали с чашек и инкубировали на льду в течение 30 мин в 2 мл лизирующего буфера (20 мМ Tris-HCl (pH 7.4), 137 мМ NaCl, 2 мМ EDTA, 10% глицерин, 1% Triton X-100, 1% PMSF, коктейль ингибиторов протеаз Complete). Аналогично клетки (~50 × 10⁶), обработанные 70 мкМ цисплатином, снимали с чашек, трижды отмывали в холодном растворе PBS, а затем 30 мин лизировали на льду в 2 мл того же лизирующего буфера.

Лизаты контрольных и обработанных клеток центрифугировали (13000 об/мин, 25 мин, 4°C), отделяли супернатант, из которого отбирали контрольную пробу для определения количества белка по методу Бредфорд, анализа с помощью Вестерн-блота и тестирования активности каспазы-2. Оставшиеся лизаты использовали для проведения гель-фильтрации.

Гель-фильтрацию проводили с использованием хроматографа низкого давления BioLogic LP System (Bio-Rad, США) и колонки 16/50 GL Amersham с носителем Superose 6 (GE Healthcare, Великобритания) в 20 мМ Hepes-KOH-буфере, pH 7.5, содержащем 80 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 1 мМ EDTA, 1 мМ EGTA, 1 мМ DTT, 1 мМ

PMSF и 1 мМ NaN₃, при скорости потока 1 мл/мин. Детектирование осуществляли по величине оптического поглощения элюатов при длине волны 280 нм. Для калибровки колонки использовали набор маркеров Gel Filtration Standard (Bio-Rad, США).

Иммунопреципитация

Для ИП использовали либо полные лизаты клеток, либо фракции, полученные в результате гель-фильтрации. Для получения лизатов контрольные и стимулированные клетки обрабатывали, как описано выше при получении лизатов для гель-фильтрации. С целью устранения неспецифической сорбции проводили стадию предочистки: к фракциям из гель-фильтрации или лизатам клеток добавляли поликлональные антитела к белку AIF (Santa Cruz Biotechnology, США), выдерживали 1 ч при 4°C, затем добавляли протеин-А-сефарозу (Sigma, США), перемешивали 3–4 ч при 4°C, после чего образец центрифугировали (5900 об/мин, 1 мин, 4°C) и отбирали супернатант.

К супернатанту добавляли необходимое количество кроличьих поликлональных антител против каспазы-2 (Santa Cruz, США), перемешивали 2 ч (4°C), далее добавляли протеин-А-сефарозу, предварительно проинкубированную с 10% бычьим сывороточным альбумином, и выдерживали в течение ночи (4°C) при перемешивании. Затем проводили центрифугирование образца (5900 об/мин, 1 мин, 4°C) и отбирали супернатант. Далее носитель промывали 10 мМ Tris-HCl-буфером, pH 7.4, содержащим 100 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 1 мМ EGTA, 1% Triton X-100, 1% PMSF и коктейль ингибиторов протеаз, (4 раза по 1 мл) и раствором PBS (1 раз). Затем удаляли остатки буфера, после чего к протеин-А-сефарозе добавляли 2-кратный буфер для нанесения на гель.

Метод siRNA

Для трансфекции были взяты клетки Caov-4, достигшие 70% конфлюентности (0.5 × 10⁶). Клетки помещали в среду OPTI-MEM без антибиотика (Gibco, США). Для введения siRNA против белка RAIDD (Dharmacon, США) или контрольной siRNA (Dharmacon, США) в количестве 100 пмоль использовали набор RNAiMAX (Invitrogen, США). Через 6 ч меняли среду OPTI-MEM на DMEM без антибиотиков и добавляли цисплатин через 20 ч инкубации с siRNA.

Измерение активности каспазы-2

Для измерения активности использовали либо образцы ИП (1/5 от всего образца), либо фракции, полученные при гель-фильтрации. В образцы добавляли по 25 мкл буфера (20 мМ Hepes-KOH, pH 7.4, 10% сахароза, 0.1% Chaps, 5 мМ DTT, 50 мкМ субстрат Ac-VDVAD-AMC (Pepta-

Nova, Германия)). Флуоресценцию измеряли на приборе Variokan Flash (Thermo scientific, США), длина волны поглощения — 380 нм, длина волны испускания — 460 нм. Измерения проводили в течение 20 мин с интервалом 1 мин при 37°C. Полученные данные относительно количества расщепленного субстрата и генерации флуоресцентного сигнала были обработаны в программе Microsoft Excel, и на их основании были построены графики активности каспазы-2.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда № 14-25-00056. Работа лаборатории также поддерживается грантами РФФИ №№ 14-04-00699-а, 14-04-31090-мол_а и грантом фонда Династия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vaux D.L., Korsmeyer S.J. // *Cell*. 1999. V. 96(2). P. 245–254.
2. Stennicke H.R., Salvesen G.S. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2000. V. 1477. P. 299–306.
3. Zamaraev A.V., Kopeina G.S., Zhivotovsky B., Lavrik I.N. // *Cell Mol. Life Sci*. 2015. V. 72(3). P. 505–517.
4. Hughes M.A., Langlais C., Cain K., MacFarlane M. // *Methods*. 2013. V. 61(2). P. 98–104.
5. Schleich K., Warmken U., Fricker N., Öztürk S., Richter P., Kammerer K., Schnölzer M., Krammer P.H., Lavrik I.N. // *Mol. Cell*. 2012. V. 47(2). P. 306–319.
6. Dickens L.S., Powley I.R., Hughes M.A., MacFarlane M. // *Exp. Cell Res*. 2012. V. 318(11). P. 1269–1277.
7. Zhivotovsky B., Orrenius S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2005. V. 331(3). P. 859–867.
8. Tinel A., Tschopp J. // *Science*. 2004. V. 304(5672). P. 843–846.
9. Vakifahmetoglu H., Olsson M., Orrenius S., and Zhivotovsky B. // *Oncogene*. 2006. V. 25. P. 5683–5692.
10. Manzi C., Krumschnabel G., Bock F., Sohm B., Labi V., Baumgartner F., Logette E., Tschopp J., Villunger A. // *J. Cell Biol*. 2009. V. 185. P. 291–303.
11. Kim I.R., Murakami K., Chen N.J., Saibil S.D., Matysiak-Zablocki E., Elford A.R., Bonnard M., Benchimol S., Jurisicova A., Yeh W.C., Ohashi P.S. // *Apoptosis*. 2009. V. 14(9). P. 1039–1049.
12. Imre G., Heering J., Takeda A.N., Husmann M., Thiede B., zu Heringdorf D.M., Green D.R., van der Goot F.G., Sinha B., Dötsch V., Rajalingam K. // *EMBO J*. 2012. V. 31(11). P. 2615–2628.
13. Lazebnik Y.A., Kaufmann S.H., Desnoyers S., Poirier G.G., Earnshaw W.C. // *Nature*. 1994. V. 371(6495). P. 346–347.
14. Bergeron L., Perez G.I., Macdonald G., Shi L., Sun Y., Jurisicova A., Varmuza S., Latham K.E., Flaws J.A., Salter J.C., Hara H., Moskowitz M.A., Li E., Greenberg A., Tilly J.L., Yuan J. // *Genes Dev*. 1998. V. 12(9). P. 1304–1314.
15. Park H.H., Logette E., Rauser S., Cuenin S., Walz T., Tschopp J., Wu H. // *Cell*. 2007. V. 128. P. 533–546.
16. Simbulan-Rosenthal C.M., Rosenthal D.S., Iyer S., Boulares A.H., Smulson M. E. // *J. Biol. Chem*. 1998. V. 273. P. 13703–13712.
17. Talanian R.V., Quinlan C., Trautz S., Hackett M.C., Mankovich J.A., Banach D., Ghayur T., Brady K.D., Wong W.W. // *J. Biol. Chem*. 1997. V. 272. P. 9677–9682.
18. Reubold T.F., Eschenburg S. // *Cellular Signalling*. 2012. V. 24. P. 1420–1425.
19. Yuan S., Yu X., Asara J.M., Heuser J.E., Ludtke S.J., Akey C.W. // *Structure*. 2011. V. 19(8). P. 1084–1096.
20. Baliga B. // *Cell Death Differ*. 2004. V. 11(11). P. 1234–1241.

Identification of New Complex for Caspase-2 Activation upon DNA Damage

G. S. Kopeina^{*, +}, A. V. Zamaraev^{*, +}, B. D. Zhivotovsky^{*, **}, I. N. Lavrik^{*, ***}, #

#Phone: +7 (495) 932-98-30; e-mail: ilav3103@gmail.com

*Faculty of Basic Medicine, Lomonosov Moscow State University, 119991 Russia, Moscow, Lomonosovsky prospect 31/5

**Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institutet, Box 210, 17177 Stockholm, Sweden

***Department of Translational Inflammation, Institute of Experimental Internal Medicine, Otto von Guericke University, Magdeburg, Germany

+ Equal Contribution

Caspase-2 plays initiator role in apoptotic cell death in response to DNA damage. The mechanism of caspase-2 activation was studied in human ovarian cancer cells Caov-4 treated with chemotherapeutic DNA-damaging agent cisplatin. For the isolation of the protein complex essential for caspase-2 activation a combination of gel-filtration and immunoprecipitation approaches was used. On the first step the caspase-2 activation complex was separated from caspase-2 monomers using gel-filtration. Immunoprecipitation from gel-filtration fractions allowed us to isolate the complex containing caspase-2. The complex was found to contain catalytically-active caspase-2. The analysis of these samples revealed RAIDD- and PIDDosome-independent activation of caspase-2. Taken together, the existence of putative alternative platform for caspase-2 activation was demonstrated using the developed method for isolation of protein complexes.

Keywords: apoptosis, caspase-2, high molecular weight complex, ovarian carcinoma, cancer