ОПТИМИЗАЦИЯ ДЛИНЫ ЛИНКЕРА В ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫХ СЕНСОРАХ КАСПАЗЫ-3

Лапшин Г.Д., Горященко А.С, Хренова М.Г, Русанов А.Л, Ивашина Т.В, Жердева В.В., Савицкий А.П
Учреждение Российской академии наук Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

Флуоресцентный молекулярный имиджинг - новое направление научных исследований, позволяющее получать информацию о молекулярных и клеточных событиях в живом организме в режиме реального времени. Огромный прорыв в области флуоресцентного имиджинга произошел благодаря использованию флуоресцирующих белков в качестве генетически кодируемых сенсоров [1]. Большое разнообразие флуоресцентных белков с взаимоперекрывающимися спектрами поглощения и флуоресценции создает возможность подбора пар для индуктивно-резонансного переноса энергии (FRET). Экспрессия в единой рамке считывания генов флуоресцентных белков и целевой нуклеотидной последовательности создает уникальные возможности конструирования сенсоров различной функциональности. В молекулярной онкологии активно исследуется роль различных ферментов в процессе образования и метастазирования опухолевых клеток в организме. Детекция каспазы-3 – ключевого фермента апоптоза - может оказаться полезным для оценки эффективности действия лекарственных средств, в особенности препаратов направленного действия [2].

Основой полученных в работе биосенсоров является конструкция на основе двух красных флуоресцирующих белков, между которыми происходит индуктивно-резонансный перенос энергии, и линкера DEVD, расщепляемого каспазой-3. При расщеплении происходит нарушение условий FRET, что ведет к изменению характеристик флуоресцентного сигнала: изменению интенсивности сигнала и/или изменению времени жизни флуоресценции. Режим флуоресцентных измерений с временным разрешением обладает более высокой чувствительностью и позволяет регистрировать расщепление конструкции при низких концентрациях каспазы-3, когда относительные изменения интенсивности флуоресценции крайне низки. Важным условием эффективного разрезания линкера каспазой-3 является его доступность. Доступность сайта расщепления с линкерами различного состава была изучена методами молекулярной динамики с использованием программных пакетов GROMACS (http://www.gromacs.org/Downloads) и VMD (http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/).

Расчеты проводились на кластере СКИФ МГУ. Из вышеприведенного анализа траектории свободной динамики структуры сенсора с сайтом распознавания каспазы-3 можно сделать следующие выводы:

- Структура KFP стабильна. Не наблюдается каких-либо признаков разворачивания третичной структуры. Структура TagRFP менее стабильна, чем KFP – для двух из рассмотренных конструкций происходит частичное разворачивание третичной структуры TagRFP. Данные наблюдения требуют дополнительного исследования.
- Взаиморасположение флуоресцирующих белков меняется со временем, как и расстояние между их хромофорами. При этом вне зависимости от длины и структуры линкера в исходной конфигурации расстояние между хромофорами составляет около 120 А. В конечной конформации расстояние между хромофорами составляет от 30 до 40 А, причем оно не коррелирует с длиной и составом линкера – для самого короткого из рассмотренных линкеров оно составляет 40 А. Во всех рассмотренных случаях результатом динамики является сближение белков до их непосредственного контакта.
-В компьютерных моделях сенсоров было показано, что в течение времени линкер претерпевает структурные изменения, однако во всех рассмотренных случаях в итоговой конформации наиболее важная его часть – сайт распознавания – стабилен и стерически доступен, располагаясь над поверхностью взаимодействия белков, входящих в сенсор. Моделирование показало, что наиболее удобными для расщепления каспазой-3 являются синтетический линкер GTGGSGGDEVDGTGGSGDPPVAT и линкер на основе природного субстрата VKSEGKRKGDEVDGVDEV.

Работа выполнена в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2013 годы» Министерства образования и науки Российской Федерации (Государственный контракт № 16.512.11.2137).

Список литературы

1.Ray P.Gambir S. in: Molecular imaging in repoter genes. Ed. By Gambir S.S., Yaghoubi Sh.S.. (2010) Cambrige, P.113-126.
2.Stoffel A (2010) Targeted therapies for solid tumors: current status and future perspectives. BioDrugs 24:303–316.