

УДК 576.52;577.352

# Применение метода двумерного электрофореза для изучения состава рецепторного комплекса, образуемого на рецепторе CD95/Fas

Д. Риесс, И. Н. Лаврик\*

Немецкий научный центр раковых исследований, 69120, Гейдельберг, Германия

\*E-mail: i.lavrik@dkfz-heidelberg.de

Поступила в редакцию 25.05.2010 г.

**РЕФЕРАТ** Активация рецептора CD95 (APO-1/Fas) приводит к инициации апоптоза в клетках эукариот. Индукция апоптоза начинается с образования белкового комплекса на рецепторе CD95 (APO-1/Fas), который получил название DISC (death-inducing signaling complex, сигнальный комплекс, индуцирующий гибель клеток). В представленной работе для анализа состава рецепторного комплекса DISC применили методы протеомики. Предположили, что состав комплекса DISC играет ключевую роль в инициации апоптоза. С помощью метода двумерного электрофореза проанализировали комплексы DISC в клетках двух типов, различающихся скоростью индукции апоптоза. Показано, что клетки обоих типов содержат такие основные компоненты комплекса DISC, как рецептор CD95, адаптерная молекула FADD и прокаспазы-8. Также с помощью двумерного электрофореза удалось выявить различия в составе рецепторного комплекса CD95, выделенного из клеток двух типов. Таким образом, методами протеомики показано, что белковый состав комплекса DISC не одинаков в клетках двух типов, что может определять различия в скорости инициации апоптоза.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** апоптоз, рецептор CD95, двумерный электрофорез, DISC.

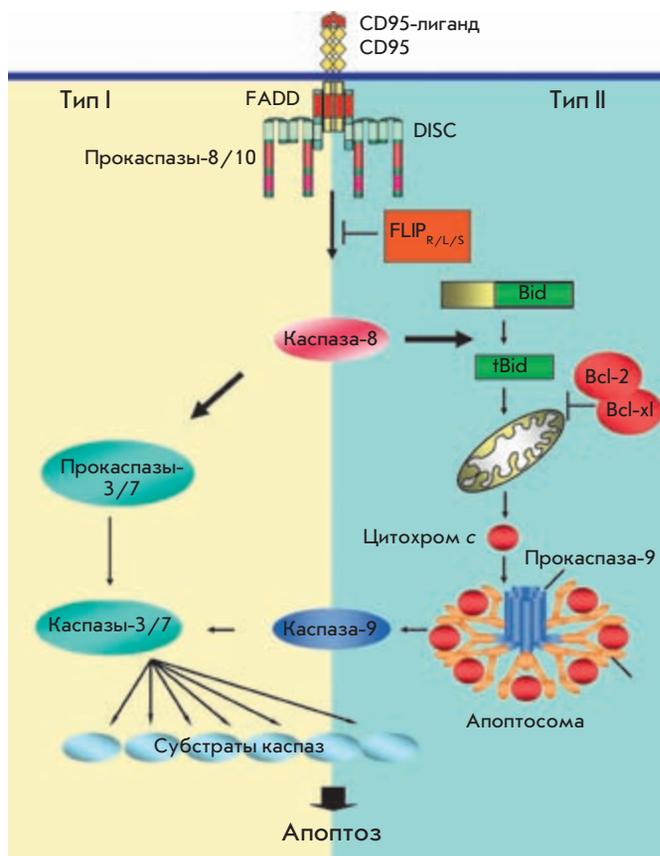
## ВВЕДЕНИЕ

Способность запускать самоликвидацию, или апоптоз, является неотъемлемым свойством клеток высших эукариот [1]. В клетках млекопитающих существует несколько программ инициации клеточной гибели в ответ на повреждение ДНК, при отсутствии факторов роста, а также в ответ на активный сигнал смерти, передаваемый секретлируемыми или мембраносвязанными цитокинами через так называемые рецепторы смерти [1, 2].

Семейство рецепторов смерти состоит из восьми белков: TNF-R1, CD95 (APO-1/Fas), DR3, TRAIL-R1, TRAIL-R2, DR6, EDA-R и NGF-R [2]. Считается, что для передачи сигнала эти рецепторы должны образовывать олигомерные структуры, предположительно тримеры [1–3]. Цитоплазматическая часть рецепторов смерти содержит так называемые домены смерти, которые характеризуются способностью к гомотипической олигомеризации. Адаптерные молекулы, содержащие такой домен, и вовлекаются в рецепторный комплекс.

Наиболее полно изучен механизм передачи сигнала клеточной гибели через CD95/APO-1/Fas [1, 3]. Сборка активного инициаторного комплекса, называемого DISC, происходит за секунды после связывания лиганда CD95 с рецептором CD95 [3–5]. В качестве адаптера рецептор использует белок FADD, содержащий домен смерти. Второй функциональный домен этой молекулы – DED (death

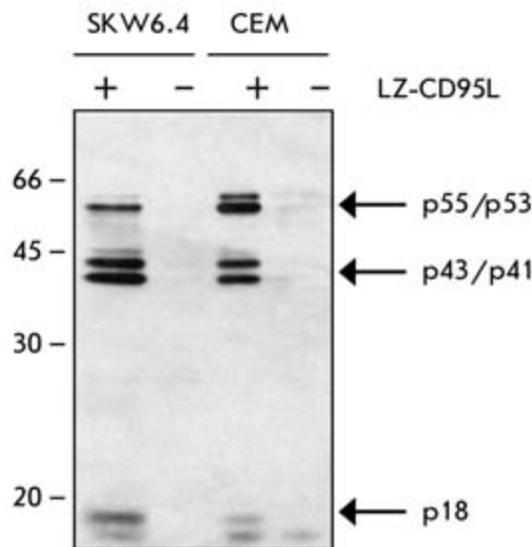
effector domain) – за счет гомотипических белок-белковых взаимодействий рекрутирует в рецепторный комплекс прокаспазу-8, которая затем подвергается аутопротеолитическому расщеплению с образованием активной формы каспазы-8 (рис. 1). На следующих этапах активируются каспазы-3 и -7, а затем и субстраты апоптоза [2] (рис. 1). Характерная особенность механизма передачи сигнала смерти через CD95 состоит в существовании двух типов сигнальных путей, которые встречаются в клетках двух типов [4] (рис. 1). В клетках первого типа повышено количество комплекса CD95 DISC и соответственно активной каспазы-8, которая затем расщепляет каспазы-3 и -7 [4]. В клетках второго типа комплекс CD95 DISC образуется менее эффективно, и они содержат гораздо меньше каспазы-8, чем клетки первого типа. Поэтому для эффективной индукции апоптоза клетки второго типа нуждаются в амплификации сигнала, что достигается с помощью следующего механизма: активированная каспаза-8 расщепляет молекулу Bid, и образовавшийся фрагмент tBid транслоцируется в митохондрии, что приводит к выходу цитохрома с в цитоплазму с последующим формированием комплекса апоптосомы. В апоптосоме происходит активация каспазы-9, которая в свою очередь расщепляет (активирует) каспазы-3 и -7 (рис. 1). К клеткам первого типа относятся клеточные линии В-лимфоцитов SKW6.4, Raji, BJAB; клеточные линии Т-лимфоцитов Hut78, а также перифериче-



**Рис. 1.** Два типа передачи сигнала через рецептор CD95. Под действием лиганда на мембране происходит сборка комплекса CD95 DISC. Связывание молекулы FADD обусловлено взаимодействием доменов смерти DD (death domain). За счет взаимодействий DED (death effector domain)-доменов в комплекс поступают прокаспазы-8/10 и с-FLIP. При связывании прокаспазы-8 в комплекс CD95 DISC происходит образование активной каспазы-8. Затем в клетках первого типа, которые характеризуются повышенным образованием комплекса CD95 DISC и соответственно активной каспазы-8, апоптоз зависит от активации каспаз-3 и -7. В клетках второго типа образуется гораздо меньшее количество комплекса CD95 DISC, и для эффективной индукции апоптоза необходима амплификация сигнала, включающая расщепление Bid с помощью каспазы-8, транслокацию tBid в митохондрии, выход цитохрома с из митохондрий, образование апоптосомы и последующую активацию каспаз.

ские Т-клетки. К клеткам второго типа относятся клеточные линии Т-лимфоцитов СЕМ и Jurkat [4].

Природа различий между клетками первого и второго типа пока не установлена. Предполагается, что белковый состав комплекса CD95 DISC в клетках разного типа не одинаков. Вероятно, в клетках второго типа в состав комплекса CD95 DISC входят белки, ингибирующие активацию прокаспазы и инициацию апоптоза. Проверка этой гипотезы, а именно сравнительный анализ белкового состава комплекса CD95 DISC в клетках двух типов с помощью методов протеомики, и стала задачей нашей работы.



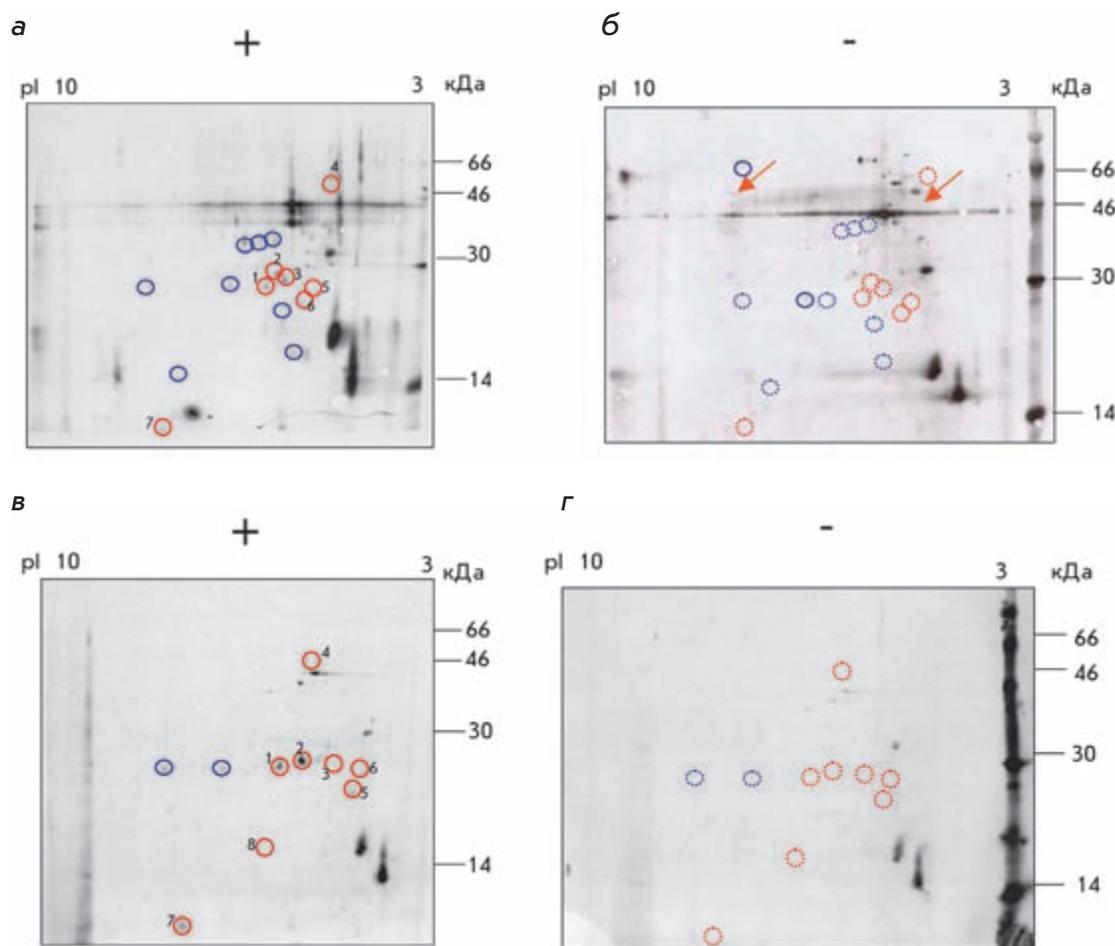
**Рис. 2.** Контроль образования CD95 DISC с помощью вестерн-блоттинга. Иммунопреципитаты CD95 (1/10 от количества образца, нанесенного на двумерный гель) анализировали с помощью одномерного электрофореза и вестерн-блоттинга с моноклональными антителами С15 против каспазы-8. Положение прокаспазы-8 (p55/p53) и продуктов ее расщепления p43/p41, p18 и p10 указано стрелками.

В представленной работе методом двумерного электрофореза проанализирован состав комплекса CD95 DISC. Этот метод основан на электрофоретическом разделении белков в двух направлениях – в соответствии с величинами изоэлектрических точек (pI) в первом и в соответствии с молекулярной массой ( $M_r$ ) во втором [6]. Этот подход является важнейшей частью современной стратегии протеомных исследований. Вместе с тем существуют с различными модификации двумерного электрофореза, что позволяет анализировать белковые комплексы различной сложности. Мы использовали метод с иммобилизованными градиентами pH (IPG) как подход, обладающий высокой воспроизводимостью [7]. Проанализирован состав рецепторного комплекса CD95 в интервале pI от 3 до 10, а также подобраны условия проведения двумерного электрофореза в области pI 6–11 с последующим анализом белков, ассоциированных с рецептором CD95. Наш анализ позволил найти различия в белковом составе комплекса CD95 DISC, выделенного из клеток двух типов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Реактивы и биопрепараты

В работе использовали следующие реактивы и материалы: 1,4-дитио-D,L-треитол (DTT), N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (TEMED), мочевины, додецилсульфат натрия (SDS), акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, белок-A-сефарозу фирмы «Serva»;



- Охарактеризованные белки DISC
- 1, 2 – FADD, CAP1 и CAP2
- 4 – Прокаспаз-8 (CAP4 = p55)
- 3, 5, 6 – Продукты расщепления прокаспазы-8 (CAP3, CAP5 = p26 и CAP6 = p24)
- 7, 8 – Каспаза-8 (p10, p18)
- Неохарактеризованные белки DISC

Рис. 3. Анализ CD95 DISC в клетках первого (SKW6.4) и второго (CEM) типа. К  $5 \times 10^7$  клеток SKW6.4 добавили LZ-CD95L (а) или оставили без стимуляции (б). К  $7 \times 10^7$  клеток CEM добавили LZ-CD95L (в) или оставили без стимуляции (г). Иммунопреципитаты CD95 анализировали с помощью двумерного электрофореза в области pI от 3 до 10. Время экспозиции радиоавтограмм – 4 недели. Представлен один из трех экспериментов. Положение CD95 отмечено стрелками. Положения основных белков комплекса CD95 указано номерами. Дифференциальные пятна показаны сплошной линией, отсутствие пятна – пунктиром.

персульфат аммония, хлорид аммония, бромфеноловый синий – фирмы «Merck».

В качестве радиоактивной метки применяли [ $^{35}\text{S}$ ]Met и [ $^{35}\text{S}$ ]Cys фирмы «Amersham».

В работе использовали линии В- и Т-лимфоцитов, SKW6.4 и CEM, соответственно, а также среды для культивирования клеток RPMI фирмы «Gibco». LZ-CD95L был приготовлен как описано ранее [8]. Моноклональные антитела к каспазе-8 C15 и C5 [9]; а также анти-АРО-1 [10] приготовлены в лаборатории согласно ранее описанному методу. Использовали поликлональные антитела к рецептору CD95 (C20) фирмы «Santa Cruz».

#### Мечение клеток [ $^{35}\text{S}$ ]

Для радиоактивного мечения  $5 \times 10^7$  клеток SKW6.4 или  $7 \times 10^7$  клеток CEM переносили в среду RPMI без метионина и цистеина. После инкубации в течение 1 ч при тем-

пературе  $37^\circ\text{C}$  к клеткам добавляли [ $^{35}\text{S}$ ]Met и [ $^{35}\text{S}$ ]Cys, а затем культуры клеток растили в течение 24 ч до проведения эксперимента.

#### Иммунопреципитация рецептора CD95

К  $5 \times 10^7$  клеток SKW6.4 или  $7 \times 10^7$  клеток CEM добавляли лиганд LZ-CD95L (концентрация 10 мкг/мл), инкубировали в течение 10 мин при температуре  $37^\circ\text{C}$ . Получение клеточных лизатов, иммунопреципитацию комплекса и вестерн-блоттинг проводили как описано в [11].

#### Двумерный электрофорез

Для изоэлектрофокусирования образцов в первом направлении применяли готовые стрипы с нанесенными амфолинтами длиной 18 см, с pI от 6 до 11 («Amersham»).

Для изоэлектрофокусирования клеточных лизатов к 10 мкл лизатов добавляли 340 мкл буфера А (9 М мочеви-

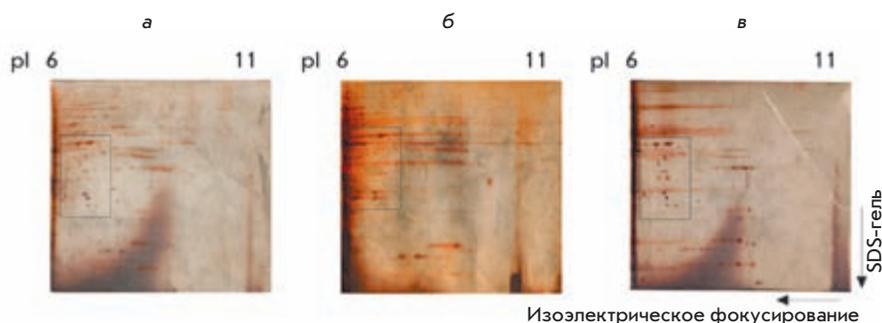


Рис. 4. Оптимизация условий изоэлектрофокусирования. Проведено изоэлектрофокусирование клеточных лизатов, полученных из  $10^7$  клеток SKW6.4. Затем образцы наносили на 12% гель и проводили электрофорез по Лэммли. Белки окрашивали серебром. Изоэлектрофокусирование проводили в буфере А (а, в) и буфере Б (б). Был применен следующий протокол для изоэлектрофокусирования: (а, б) 12 ч – дегидратация, 1 ч – 500 В, 1 ч – 1000 В, 1 ч – 3000 В, 8000 В до достижения 60000 В/ч. (в) 12 ч – дегидратация, 1 ч – 100 В, 1 ч – 150 В, 1 ч – 300 В, 1 ч – 400 В, 1 ч – 500 В, 1 ч – 1000 В, 1 ч – 3000 В, 8000 В до достижения 180000 В/ч.

ны, 2% CHAPS, 18 мМ DTT, 0.001% бромфенолового синего, 0.5% IPG-буфера фирмы «Amersham») или буфера Б (9 М мочевины, 2% NP-40, 18 мМ DTT, 0.001% бромфенолового синего, 0.5% IPG-буфера фирмы «Amersham»).

Для изоэлектрофокусирования иммунопреципитатов белки после иммунопреципитации элюировали с белок-А-сефарозы в течение 30 мин при комнатной температуре буфером А.

После изоэлектрофокусирования стрипы инкубировали в течение 20 мин в буфере: 50 мМ Трис-НСl, рН 8.8, 6 М мочевины, 30% глицерина, 65 мМ DTT, 0.001% бромфенолового синего. Затем повторно инкубировали в том же буфере в присутствии 2.5% йодацетамида. После этого стрипы фиксировали с помощью 0.5% агарозы на 12% SDS-полиакриламидном геле и проводили электрофорез во втором направлении.

После электрофореза гели анализировали с помощью радиоавтографии или вестерн-блоттинга. В некоторых случаях гели окрашивали серебром, используя набор фирмы «Invitrogen».

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Анализ комплекса CD95 DISC с помощью двумерного электрофореза в области рI от 3 до 10

Для проведения протеомных исследований в качестве клеток первого типа мы выбрали линию В-лимфоцитов SKW6.4, а в качестве клеток второго типа – линию Т-лимфоцитов СЕМ. Обе клеточные линии подробно охарактеризованы ранее и представляют классические примеры клеток первого и второго типа [4].

Для анализа CD95 DISC клетки SKW6.4 и СЕМ выращивали в среде, содержащей  $[^{35}\text{S}]\text{Met}$  и  $[^{35}\text{S}]\text{Cys}$ , в течение суток. Затем для инициации апоптоза культуры клеток обрабатывали лигандом – LZ-CD95L, который специфически связывается с рецептором CD95 и инициирует образование рецепторного комплекса. После этого проводили иммунопреципитацию комплекса CD95 DISC с помощью моноклональных антител анти-АПО-1. Моноклональные антитела анти-АПО-1 распознают внеклеточный домен рецептора CD95 и применяются для иммунопреципитации рецептора или комплекса CD95 DISC [10–12]. Имму-

нопреципитаты анализировали с помощью двумерного электрофореза.

Эффективность иммунопреципитации контролировали, проводя одномерный электрофорез с использованием одной десятой части образца, анализируемого методом двумерного электрофореза, с последующим вестерн-блоттингом со специфическими моноклональными антителами против каспазы-8 (рис. 2). Этот анализ выявил присутствие в CD95 DISC как прокаспазы-8, так и продуктов ее протеолитического расщепления р43/р41, что свидетельствует о специфичности использованного метода.

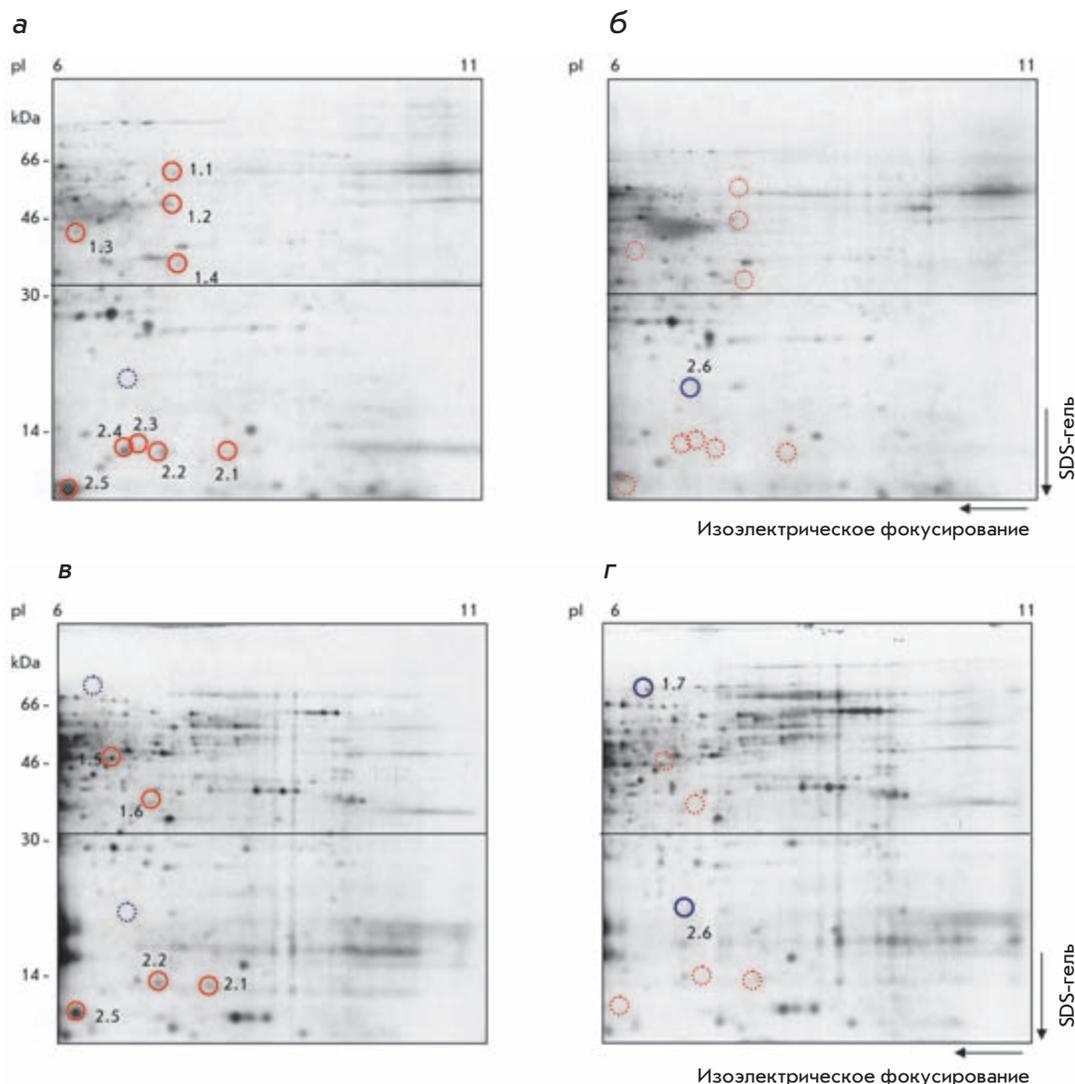
Состав комплекса CD95 DISC после иммунопреципитации проанализировали с помощью двумерного электрофореза в области рI от 3 до 10 (рис. 3). На радиоавтограммах комплекса CD95 DISC из клеток как первого, так и второго типа выявлены пятна, соответствующие по рI и молекулярной массе основным белкам комплекса CD95 DISC, охарактеризованным ранее [5, 13]. На двумерных гелях обнаружены белки CD95, FADD в двух формах – CAP1 и CAP2 (нефосфорилированной и фосфорилированной), прокаспазы-8 (CAP4) и продукты ее расщепления – CAP3, р26/р24, р18 и р10. В клетках как первого, так и второго типа выявлены новые, неохарактеризованные компоненты комплекса CD95 DISC (рис. 3). Интересно, что молекулярные массы и рI новых белков CD95 DISC были разными в клетках разного типа, что указывает на различия в составе комплекса CD95 DISC.

### Анализ комплекса CD95 DISC с помощью двумерного электрофореза в области рI от 6 до 11

Поскольку разрешение метода в области выше рI 6 довольно низкое, нам удалось установить только часть белков, возможно, ассоциированных с CD95. Соответственно огромный интерес представляли белки комплекса CD95 DISC в области рI от 6 до 11.

Известно, что изоэлектрофокусирование в области рI 6–11 осложнено электроосмосом воды и миграцией DTT в сторону анода [14]. Все это значительно ухудшает качество “картины” двумерного электрофореза. Поэтому сначала мы попытались подобрать оптимальные условия изоэлектрофокусирования. С этой целью приготовили лизаты клеток SKW6.4 и провели изоэлектрофокусирование, ис-

**Рис. 5.** Анализ CD95 DISC в клетках первого (SKW6.4) и второго (СЕМ) типа. К  $5 \times 10^7$  клеток SKW6.4 добавили LZ-CD95L (а) или оставили без стимуляции (б). К  $7 \times 10^7$  клеток СЕМ добавили LZ-CD95L (в) или оставили без стимуляции (г). Иммунопреципитаты CD95 анализировали с помощью двумерного электрофореза в области pI от 6 до 11. Время экспозиции радиоавтограмм – 4 недели. Представлен один из трех экспериментов. Дифференциальные пятна показаны сплошной линией, отсутствие пятна – пунктиром.



пользуя различные протоколы и детергенты (CHAPS и NP-40) в буфере для первого направления (рис. 4). В качестве критерия качества результатов двумерного электрофореза мы рассматривали количество полученных пятен и их разрешение.

Разрешение было существенно лучше при использовании детергента CHAPS (рис. 4а) по сравнению с детергентом NP-40 (рис. 4б). Протокол изоэлектрофокусирования, использованный в наших экспериментах (рис. 4а,б), включал всего четыре режима напряжения: 500, 1000, 3000 и 8000 В. Для того чтобы получить еще более высокое разрешение двумерного электрофореза мы попытались использовать восемь режимов напряжения (от 100 до 8000 В) и более продолжительное время изоэлектрофокусирования (рис. 4в). По-видимому, эти условия способствовали более эффективному вхождению белков в гель, поскольку разрешение при этом значительно улучшилось (рис. 4в). Таким образом, в дальнейшем мы использовали детергент CHAPS в буфере для первого направления и такие же условия изоэлектрофокусирования, как на рис. 4в.

Для сравнительного анализа комплекса CD95 DISC в области pI выше 6 в качестве клеток первого типа мы выбрали клеточную линию В-лимфоцитов SKW6.4, а в качестве клеток второго типа – линию Т-лимфоцитов СЕМ. Клетки SKW6.4 и СЕМ выращивали в среде, содержащей [<sup>35</sup>S]Met и [<sup>35</sup>S]Cys, в течение суток. Затем для образования комплекса CD95 DISC культуры клеток обрабатывали лигандом LZ-CD95L, после чего комплекс CD95 DISC иммунопреципитировали с помощью моноклональных антител анти-АРО-1, а затем анализировали методом двумерного электрофореза в оптимизированных условиях.

На радиоавтограммах обнаружен ряд белков, которые появляются в CD95 DISC клеток как первого (рис. 5а), так и второго типа (рис. 5в). Всем белкам, имеющим молекулярную массу более 30 кДа, присвоены номера от 1.1 до 1.7, а до 30 кДа – номера от 2.1 до 2.7 (рис. 5). Молекулярные массы и pI дополнительных белков CD95 DISC из клеток первого и второго типа различались, за исключением пятна 2.5, которое присутствовало в клетках обоих типов. Следовательно, белковый состав двух комплексов не одинаков.

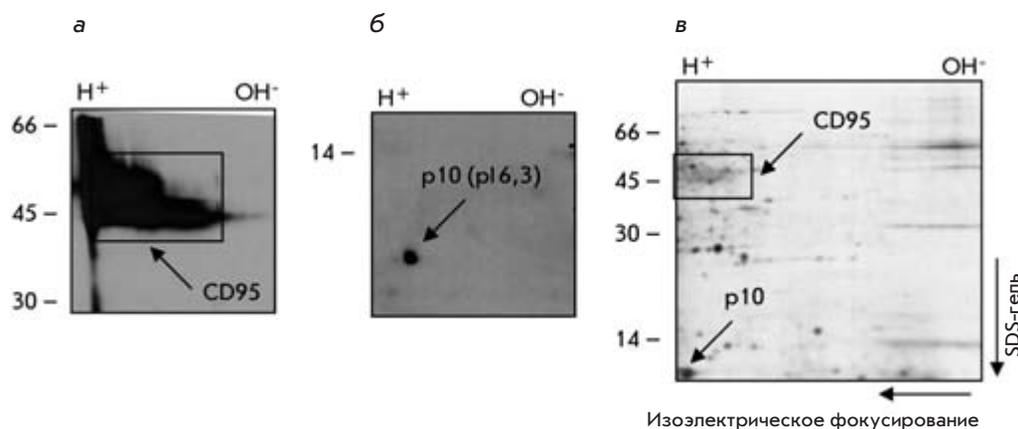


Рис. 6. Анализ двумерных электрофорезов с помощью вестерн-блоттинга. CD95 DISC, иммунопреципитированный из клеточной линии SKW6.4, анализировали методом двумерного электрофореза с помощью вестерн-блоттинга со специфическими поликлональными антителами C20 против рецептора CD95 (а) и с моноклональными антителами C15 против каспазы-8 (б). На радиоавтограмме (в) показано положение каспазы-8 и рецептора CD95.

Эффективность иммунопреципитации контролировали, как описано выше и на рис. 2. Также с помощью вестерн-блоттинга нам удалось локализовать положение уже известных компонентов комплекса на двумерных гелях: CD95 (рис. 6а,б) и активной каспазы-8 (p10) (рис. 6б). Соотнесение pI и молекулярной массы активной каспазы-8, выявляемой методом вестерн-блоттинга, с пятнами на радиоавтограммах показало, что белок 2.5 соответствует активной каспазе-8 (рис. 6в). Таким образом, мы впервые подобрали условия проведения двумерного электрофореза в области pI от 6 до 11 для анализа белков, ассоциированных с CD95.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение двумерного электрофореза позволило провести сравнительный анализ белкового состава CD95 DISC клеток первого и второго типа: SKW6.4 и СЕМ. Следует специально отметить, что различия в спектрах белков CD95 DISC из клеток первого и второго типа подтверждают гипотезу о существовании различных механизмов инициации апоптоза в этих клетках, определяющих более быструю смерть (апоптоз) клеток первого типа. В настоящий момент мы пытаемся с помощью масс-спектрометрии идентифицировать белки, обнаруженные в данной работе. ●

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Krammer P.H. // Nature. 2000. V. 407. P. 789–795.
2. Lavrik I.N., Golks A., Krammer P.H. // J. Cell Science. 2005. V. 11. P. 265–267.
3. Peter M., Krammer P.H. // Cell Death and Diff. 2003. V. 10. P. 26–35.
4. Scaffidi C., Fulda S., Srinivasan A., et al. // EMBO J. 1998. V. 17. P. 1865–1687.
5. Kischkel F.C., Hellbardt S., Behrmann I., et al. // EMBO J. 1995. V. 14. P. 5579–5588.
6. O'Farrel P.H. // J. Biol. Chem. 1975. V. 250. P. 4007–4021.
7. Gorg A., Postel W., Gunter S. // Electrophoresis. 1998. V. 9. P. 531–546.
8. Walczak H., Miller R.E., Ariail K., et al. // Nat. Medicine. 1999. V. 5. P. 157–163.
9. Scaffidi C., Medema J.P., Krammer P.H., Peter M.E. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 26953–26958.
10. Trauth B.C., Klas C., Peters A.M., et al. // Science. 1989. V. 245. P. 301–305.
11. Lavrik I.N., Golks A., Baumann S., Krammer P.H. // Blood. 2006. V. 108. P. 110–117.
12. Golks A., Brenner D., Fritsch C., Krammer P.H., Lavrik I.N. // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 14507–14513.
13. Golks A., Brenner D., Schmitz I., et al. // Cell Death and Diff. 2005. V. 13. P. 489–498.
14. Gorg A. // Methods Mol. Biol. 1999. V. 112. P. 197–209.