

Kaspaasien aktiivisuuden havainnointi fluoresenssiin
perustuvilla *in vitro* -menetelmillä

LuK-tutkielma

Kemian laitos, Turun Yliopisto

Detektioteknologia

Maaliskuu 2024

Olivia Kuivala

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu
Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

LuK-tutkielma

Pääaine: Kemia

Tekijä: Olivia Kuivala

Otsikko: Kaspaasien aktiivisuuden havainnointi fluoresenssiin perustuvilla in vitro -menetelmillä

Ohjaaja: Harri Härmä

Sivumäärä: 20 sivua

Maaliskuu 2024

Kaspaasit ovat ryhmä proteaaseja, jotka pilkkovat kohdeproteiinejaan tietyn aminohapon kohdalta. Niillä on aktiivisessa keskuksessaan kysteiniä sisältävä sivuketju, joka toimii nukleofiilinä peptidisidoksen hydrolyysissä. Kaspaasit osallistuvat muun muassa solujen tasapainon ylläpitoon, ja niitä pidetäänkin apoptoosin biomarkkereina. Apoptoottisten kaspaasien lisäksi on olemassa myös tulehduksellisia kaspaaseja. Monet sairaudet liittyvät kaspaasien ja apoptoosin epänormaaliin toimintaan. Siksi kaspaasit ovatkin potentiaalinen lääkekohde, ja niille on kehitetty erilaisia peptidi-, pienmolekyyl- ja allosteerisia inhibiittoreita.

Monet fluoresenssiin perustuvat kaspaasien aktiivisuuden havainnointiin käytettävät menetelmät hyödyntävät Försterin resonanssienergiansiirtoa (FRET), jossa energiaa siirtyy säteilemättömästi virittyneeltä donorilta akseptorille. Energiansiirto tapahtuu dipoli-dipolivuorovaikutusten avulla, kun donori ja akseptori ovat riittävän lähellä toisiaan, ja kun donorin emissiospektri on osittain päällekkäinen akseptorin absorptiospektrin kanssa. Kaspaasien havainnointiin käytettävät FRET-koettimet sisältävät tietylle kaspaasille spesifin peptidisekvenssin, johon on konjugoitu donori- ja akseptorimolekyylit vastakkaisiin päihin. Kaspaasin pilkkoessa peptidin donorin ja akseptorin välinen etäisyys kasvaa, mikä voidaan havainta joko donorin fluoresenssin kasvuna tai akseptorin fluoresenssin laskuna.

Kaspaasien havainnointiin voidaan soveltaa myös aggregaation aiheuttamaa emissiota (AIE), jossa fluoresoivan molekyylin kasautuminen aiheuttaa fluoresenssin kasvua. AIE-koettimessa on peptidi, jonka proteaasi voi tunnistaa ja pilkkoa, mikä johtaa lopulta AIE-molekyylien aggregaatioon ja siten fluoresenssiin. Lisäksi kaspaaseja voidaan havainnoida fluorokromeilla leimatuilla inhibiittoreilla, jotka sitoutuvat suoraan aktivoituneen kaspaasin aktiiviseen keskukseen.

Avainsanat: Kaspaasit, fluoresenssi

Sisällysluettelo

1.	Johdanto.....	1
2.	Kaspaasit.....	1
2.1.	Kaspaasityypit	1
2.2.	Kaspaasien ja apoptoosin aktivaatio ja toimintamekanismit.....	2
3.	Fluoresenssiin perustuvat menetelmät kaspaasien havainnoinnissa.....	5
3.1.	Försterin resonanssienergiansiirtoon perustuvat menetelmät	5
3.2.	Aggregaation aiheuttamaan emissioon perustuvat menetelmät	7
3.3.	Kultananopartikkelit.....	10
3.4.	Kvanttipisteet	12
3.5.	Grafeenioksidi	13
3.6.	Fluorokromeilla leimatut inhibiittorit	14
4.	Menetelmien vertailua	15
5.	Johtopäätökset	17
6.	Lähteet	17

1. Johdanto

Kaspaasit ovat ryhmä proteaaseja, jotka pilkkovat proteiineja tietyn asparagiinihapon kohdalta. Niillä on aktiivisessa keskuksessaan kysteiiniä sisältävä sivuketju, joka toimii nukleofiilinä peptidisidoksen hydrolyysissä.[1], [2] Kaspaasit eivät kokonaan hajota proteiineja, vaan pilkkovat ne sopivista kohdista [2].

Kaspaasit osallistuvat apoptoosiin, pyroptoosiin ja nekroptoosiin, jotka ovat erilaisia solukuoleman tyyppejä [3]. Monet sairaudet liittyvät kaspaasien ja apoptoosin epänormaaliin toimintaan [4]. Kaspaasien puutteellinen aktiivisuus voi johtaa häiriintyneiden solujen lisääntymiseen ja siten esimerkiksi kasvainten ja syövän muodostukseen. Ylenmääräinen aktiivisuus voi puolestaan johtaa esimerkiksi hermoston rappeutumiseen liiallisen solukuoleman vuoksi.[1] Siksi kaspaasit ovatkin potentiaalinen lääkekohte, ja niille on kehitetty erilaisia peptidi-, pienmolekyylis- ja allosteerisiä inhibiittoreita [5].

Monet fluoresenssia mittaavat kaspaasien aktiivisuuden havainnointimenetelmät perustuvat proteiinin pilkkoutumiseen. Havainnointiin voidaan käyttää myös fluorokromeilla leimattuja inhibiittoreita, jotka sitoutuvat aktivoituneen kaspaasin aktiiviseen keskukseseen. Tällä hetkellä proteiinin pilkkoutumiseen perustuvat menetelmät vaikuttavat tarkemmilta, ja niillä voidaan paremmin tunnistaa yksittäisiä kaspaaseja inhibiittorikoettimiin verrattuna.

2. Kaspaasit

2.1. Kaspaasityypit

Kaspaasit jaetaan tulehduksellisiin ja apoptoottisiin kaspaaseihin. Rakenteen ja aktivaatiomekanismien perusteella apoptoottiset kaspaasit voidaan jakaa edelleen aloitteentekijäkaspaaseihin (engl. initiator caspases) ja toimeenpanijakaspaaseihin (engl. effector caspases). Aloitteentekijäkaspaaseja ovat kaspaasi-2, -8, -9 ja -10. Toimeenpanijakaspaaseja ovat puolestaan kaspaasi-3, -6 ja -7. Yleisesti kaspaasit koostuvat kolmesta domeenista, joita ovat ns. prodomeeni aminotermiinalipäässä, suuri alayksikkö ja pieni alayksikkö. Aloitteentekijäkaspaaseilla on prodomeenin alueella aminotermiinalipäässä joko CAR-domeeni (engl. caspase recruitment domain) tai DE-domeeni (engl. death effect domain). CAR- ja DE-domeenit ikään kuin ohjaavat kaspaasin oikeaan paikkaan, jolloin se voi aktivoitua. Kaspaasin aktivoiva vuorovaikutus tapahtuu siis näiden domeenien kautta. [3] CAR-domeeni on kaspaasi-2:lla ja -9:llä, ja DE-domeeni on kaspaasi-8:lla ja -10:llä.

Toimeenpanijakaspaseilla prodomeeni on lyhyempi, eikä niillä siis ole prodomeenin alueella CAR- tai DE-domeenia aloitteentekijäkaspasien tavoin. [4]

Tulehduksellisia kaspaseja ovat kaspasi-1, -4, -5, -12 ja -13. Kaspasi-8 voidaan luokitella sekä apoptoottiseksi että tulehdukselliseksi. Toisin kuin apoptoottisilla kaspaseilla, tulehduksellisilla kaspaseilla on pitkä CAR-domeeni. Tulehduksellisten kaspasien tehtävä on nimensä mukaisesti säädellä solun tulehdustilaa.[4] Tulehdustilan säätely voi johtaa pyroptosiin, eli tulehduksen aiheuttamaan solukuolemaan. [6] Ihmisellä esiintyvien kaspasien ominaisuuksia ja rakenteita on esitelty tarkemmin taulukossa 1.

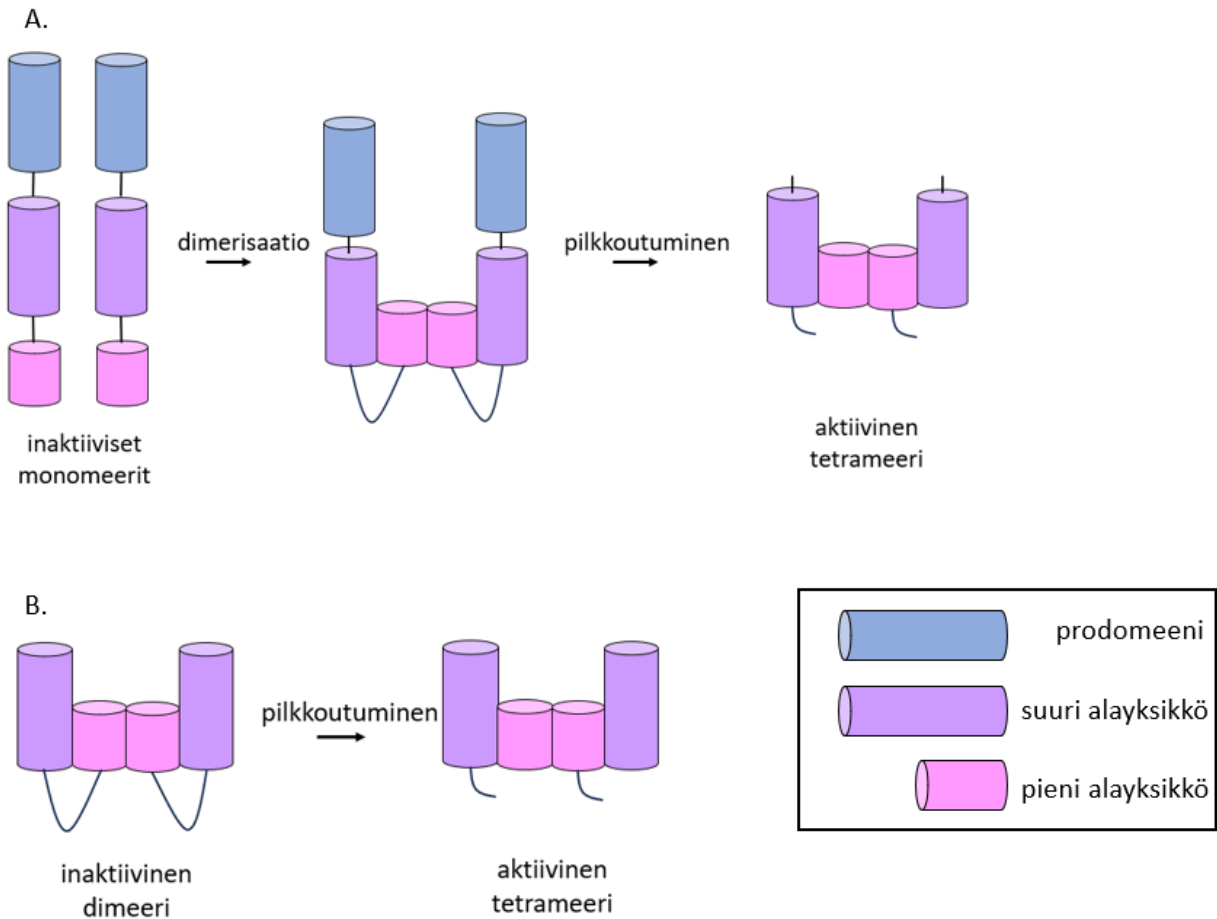
Taulukko 1. Kaspasien luokittelu ja yksinkertaistettu rakenne: L=suuri alayksikkö, S=pieni alayksikkö. Mukailtu artikkelista [4].

	Kaspasi	Domeenin rakenne	Luokittelu	Tunnistussekvenssi
Apoptoottiset	2	NH ₂ —CAR—L—S—COOH	Aloitteentekijä	VDVAD
	3	NH ₂ —L—S—COOH	Toimeenpanija	DEVD
	6	NH ₂ —L—S—COOH	Toimeenpanija	VQVD
	7	NH ₂ —L—S—COOH	Toimeenpanija	DEVD
	9	NH ₂ —CAR—L—S—COOH	Aloitteentekijä	(W/L)EHD
	10	NH ₂ —DE—DE—L—S—COOH	Aloitteentekijä	LEHD
	8	NH ₂ —DE—DE—L—S—COOH	Aloitteentekijä	LETD
Tulehdukselliset	1	NH ₂ —CAR—L—S—COOH	Aloitteentekijä	WEHD/YVAD
	4	NH ₂ —CAR—L—S—COOH	Aloitteentekijä	(W/L)EHD/LEVD
	5	NH ₂ —CAR—L—S—COOH	Aloitteentekijä	(W/L)EHD
	12	NH ₂ —CAR—L—S—COOH	Aloitteentekijä	WEHD
	13	NH ₂ —CAR—L—S—COOH	Aloitteentekijä	WEHD

2.2 Kaspasien ja apoptoosin aktivaatio ja toimintamekanismit

Prokaspasi on kaspasin inaktiivinen muoto solussa. Sen aktivoituminen vaatii proteiinin pilkkoutumisen tietyn asparagiinihappoa sisältävän sivuketjun kohdalta, prodomeenin ja alayksiköiden välistä. Aktiivinen kaspasi on tetrameeri, joka muodostuu kahdesta heterodimeeristä. Heterodimeerissä on suuri ja pieni alayksikkö. [7] Aloitteentekijäkaspasit ovat solussa inaktiivisina monomeereinä. Niiden aktivaatio tapahtuu ensin dimerisaation ja sitten pilkkoutumisen kautta. Pilkkoutuminen ei kuitenkaan ole pakollista aloitteentekijäkaspasin katalyyttisen aktiivisuuden saavuttamiseksi, sillä jo dimerisaatio

paljastaa sen aktiivisen keskuksen (kuva 1A). Aloitteentekijäkaspaasin aktivoituminen on siis kaksivaiheinen prosessi, ja vasta sen pilkkoutuminen aiheuttaa peruuttamattomasti apoptoosin. Dimerisaatio on sen sijaan mahdollista peruuttaa. Toimeenpanijakaspaasit ovat puolestaan solussa inaktiivisina dimeereinä, ja niiden aktivaatio tapahtuu yksivaiheisena pilkkoutumisen kautta. (Kuva 1B). [8]



Kuva 1. A) Aloitteentekijäkaspaasin aktivoituminen kaksivaiheisesti dimerisaation ja pilkkoutumisen kautta. B) Toimeenpanijakaspaasin aktivoituminen yksivaiheisesti pilkkoutumisen kautta. Mukailtu artikkelista [8].

Apoptoosi voi käynnistyä joko solun sisäisellä tai ulkopuolisella aktivaatiolla. Solun sisäinen aktivaatio voi johtua esimerkiksi DNA:n vaurioista, solun sisäisestä epätasapainosta tai säätelyhäiriöstä. Solun ulkopuolinen aktivaatio puolestaan aiheutuu kuolonreseptoriin (engl. death reseptor, DR) sitoutuvasta ligandista. [6]

Solun sisäiseen apoptoosin aktivoitumiseen osallistuu aloitteentekijäkaspaaseista vain kaspaasi-9 [9]. Solun sisäisessä aktivaatiossa mitokondrion ulomman kalvon hajoaminen käynnistää apoptoosin ja sytosoliin pääsee mitokondriosta proteiineja. Niistä apoptoosin kannalta tärkeitä ovat Apaf-1 (engl. apoptotic protease activating factor 1) ja sytokromi C, joita

tarvitaan apoptosomin muodostamiseen.[6] Apoptosomi puolestaan aktivoi prokaspasi-9:n. [3] Apaf-1-proteiinin CAR-domeeni kiinnittyy aktiivisen kaspasi-9:n prodomeeniin.[9], [10] Aloitteentekijäkaspasiin tarkoitus on aktivoida toimeenpanijäkaspasi, mikä tapahtuu niin ikään vuorovaikutuksessa toimeenpanijäkaspasiin prodomeenin kanssa [9].

Solun ulkopuoliseen apoptoosin aktivaatioon osallistuvat aloitteentekijäkaspaseista kaspasi-8 ja -10. Solun ulkopuolinen apoptoosin aktivaatio alkaa kuolonreseptoreista, joita ovat esimerkiksi TNFR1- (engl. tumor necrosis factor reseptor), Fas- ja TRAIL (engl. TNF-related apoptosis induced ligand) -reseptorit. Reseptoreilla on spesifit ligandit, joiden liittyminen reseptoriin aiheuttaa sen oligomerisoitumisen. Reaktioon liittyy vielä adapteriproteiineja, esimerkiksi TRADD (engl. TNFR1-associated death domain protein) tai FADD (engl. Fas-associated death domain protein). [6] Lisäksi prokaspasi-8 ja prokaspasi-10 liittyvät kompleksiin. Nämä muodostavat ns. kuolemaan johtavan signaalintikompleksin (engl. death-inducing signaling complex, DISC). [3], [6]

Kaspasiin aktivointia säätelee kaspasiin kaltainen FLIP-proteiini (engl. FLICE-like inhibitory protein), joka on myös mukana kompleksissa. FLIP-proteiini ja kaspasi ovat vuorovaikutuksessa toistensa kanssa, koska molemmilla on DE-domeeni.[11] Korkea FLIP-proteiinin pitoisuus suhteessa inaktiiviseen prokaspasi-8:aan estää prokaspasi-8:n muuntumista aktiiviseen muotoonsa. Tällöin FLIP-proteiinin vaikutus siis inhiboi apoptoosin. Toisaalta FLIP-proteiinin matala pitoisuus antaa prokaspasi-8:lle vallitsevan aseman, jolloin se voi aktivoitua.[11]

Solun ulkopuolisen apoptoosin säätelyyn osallistuu myös niin kutsuttu reseptorivuorovaikutteinen proteiinkinaasi eli RIPK1-proteiini. [6] TNFR1-reseptorista alkava apoptoosin signaalointi aiheuttaa FADD-adapteriproteiinin ja prokaspasi-8:n liittymisen signaalintikompleksiin. Signaalointi aktivoi myös NF- κ B-faktorin (engl. nuclear factor- κ B), joka edesauttaa solun selviytymistä. TNFR1-reseptorin signaalintireitti sisältää kaksi eri kompleksia, kompleksit 1 ja 2. Kompleksi 1:ssä on TNFR1-, TRADD- ja RIPK1-proteiinit. Kompleksi aktivoi NF- κ B-faktorin. Toisessa vaiheessa TRADD- ja RIPK1-proteiinit yhdistyvät FADD-proteiinin ja prokaspasi-8:n kanssa muodostaen kompleksin 2:n. Kun kompleksi 1 aktivoi NF- κ B-faktorin, kompleksi 2 ottaa mukaan FLIP-proteiinin, jolloin solu selviää. Jos puolestaan kompleksi 1:n signaali ei aktivoitu, solu ajautuu apoptoosiin kompleksin 2:n kautta, koska FLIP-proteiini ei ole inhiboimassa prokaspasi-8:aa.[12] Kompleksi 2:ssa prokaspasi-8 aktivoituu autokatalyyttisesti. Aktivoituminen aiheuttaa

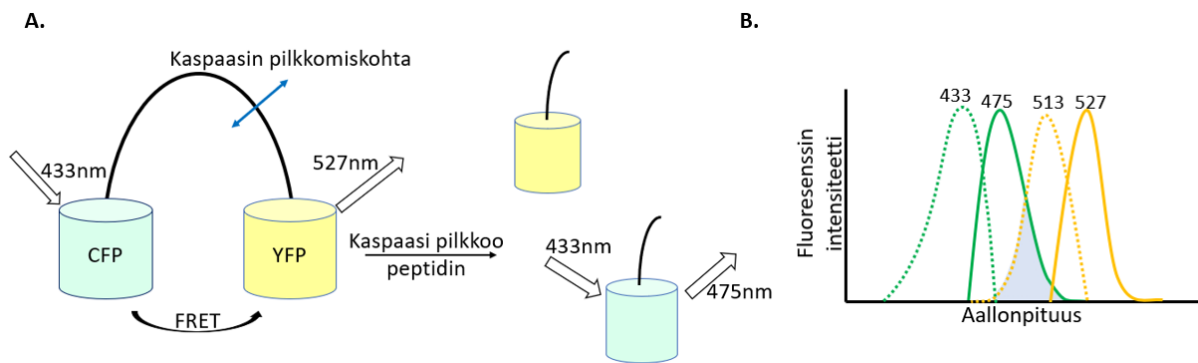
toimeenpanijakaspaasien aktivoinnin. Aktiivisen kaspaasi-8:n puuttuessa RIPK1-proteiini johtaa solun nekroptosiin toista signalointireittiä pitkin.[6]

3 Fluoresenssiin perustuvat menetelmät kaspaasien havainnoinnissa

3.1 Försterin resonanssienergiansiirtoon perustuvat menetelmät

Försterin resonanssienergiansiirto (engl. Förster resonance energy transfer, FRET) on ilmiö, jossa energiaa siirtyy säteilemättömästi virittyneeltä donorimolekyyliltä akseptorimolekyylille. Energiansiirto tapahtuu dipoli-dipolivuorovaikutusten avulla, kun donori ja akseptori ovat riittävän lähellä toisiaan, tyypillisesti noin 1—10 nm:n etäisyydellä. Lisäksi donorin emissiospektrin tulee olla osittain päällekkäinen akseptorin absorptiospektrin kanssa. [13], [14] Käytännössä FRET-ilmiö voidaan detektoida donorin fluoresenssin eliniän tai intensiteetin laskuna, kun akseptori on lisätty reaktioon. Toisaalta voidaan mitata myös akseptorimolekyylin fluoresenssin kasvua, kun donori on lisätty reaktioon.[13] Akseptori periaatteessa toimii donorin fluoresenssin sammuttajana.[15] FRET-ilmiötä voidaan hyödyntää sekä molekyylien välisten että molekyylin sisäisten vuorovaikutusten tutkimiseen. Esimerkiksi molekyylien välisiä vuorovaikutuksia voidaan tutkia liittämällä toiseen molekyyliin donori ja toiseen akseptori. Näin havaitaan, sitoutuvatko molekyylit toisiinsa, ja voidaan tutkia esimerkiksi ligandi-reseptorivuorovaikutuksia.[13]

Kaspaasien detektointiin käytettävät koettimet sisältävät peptidisekvenssin, johon on konjugoitu donori- ja akseptorimolekyylit vastakkaisiin päihin. Kun kaspaasi pilkkoo peptidin, donori ja akseptori eroavat, jolloin sammutus loppuu ja donori fluoresoi.[4] Kaspaasi-3:n aktiivisuuden havainnointiin on käytetty FRET-parissa donorina sinivihreää fluoresoivaa proteiinia (engl. cyan fluorescence protein, CFP) ja akseptorina keltaista fluoresoivaa proteiinia (engl. yellow fluorescence protein, YFP) (kuva 2). Donori ja akseptori yhdistetään linkkerillä, joka sisältää kaspaasi-3:n tunnustus- ja pilkkomissekvenssin, asparagiinihappo-glutamiinihappo-valiini-asparagiinihappo (DEVD). [16]



Kuva 2. FRET-koettimen toimintaperiaate. **A)** Koettimessa sinivihreä fluoresoiva proteiini (CFP) toimii donorina ja keltainen (YFP) akseptorina. **B)** CFP:n absorptiomaksimi on 433 nm (vihreä, katkoviiva), ja sen emissiospektri (vihreä, kiinteä) on osittain päällekkäinen YFP:n eksitaatiospektrin (keltainen, katkoviiva) kanssa. YFP virittyy FRETin kautta. Fluoresenssin intensiteetin muutosta mitataan YFP:n emission aallonpituusalueella (keltainen, kiinteä). Kaspaasin pilkkoessa peptidin energiansiirtoa ei tapahdu ja akseptori ei virity. Mukailtu artikkelista [17].

Kawai *et al.* vertailivat kaspaasi-3:n havainnoinnissa sinivihreän, vihreän (GFP), keltaisen ja punaisen (DsRed) fluoresoivan proteiinin kuutta erilaista FRET-parikombinaatiota. Pareina käytettiin sinivihreä-vihreää, keltainen-sinivihreää, keltainen-vihreää, sinivihreä-punaista, vihreä-punaista ja keltainen-punaista. Fluoresoivat proteiinit yhdistettiin 12 aminohapon pituisella peptidillä, joka sisälsi kaspaasi-3:lle tyypillisen DEVD-tunnistussekvenssin (kuva 1). Tutkimuksessa osoitettiin, että kaikilla FRET-koettimilla kaspaasin aktivaatio aiheuttaa donorin fluoresenssin kasvua tai akseptorin fluoresenssin vähenemistä. Siispä kaikki tutkitut FRET-parit toimivat kaspaasin aktivaation detektoinnissa. Mitattujen fluoresenssispektrien perusteella sinivihreä-keltainen-, keltainen-punainen- ja vihreä-punainen-pareilla on paras herkkyys. Esimerkiksi sinivihreä-vihreä-parilla on heikompi herkkyys siksi, että donorin ja akseptorin fluoresenssispektrit ovat keskenään hyvin samankaltaiset ja niitä on vaikeaa erottaa toisistaan. Tutkimuksessa onnistuttiin detektoimaan kaspaasi-3:n rinnalla myös kaspaasi-8:aa ja kaspaasi-9:ää käyttäen sinivihreä-punainen- ja keltainen-punainen-sensoreita samanaikaisesti. [17]

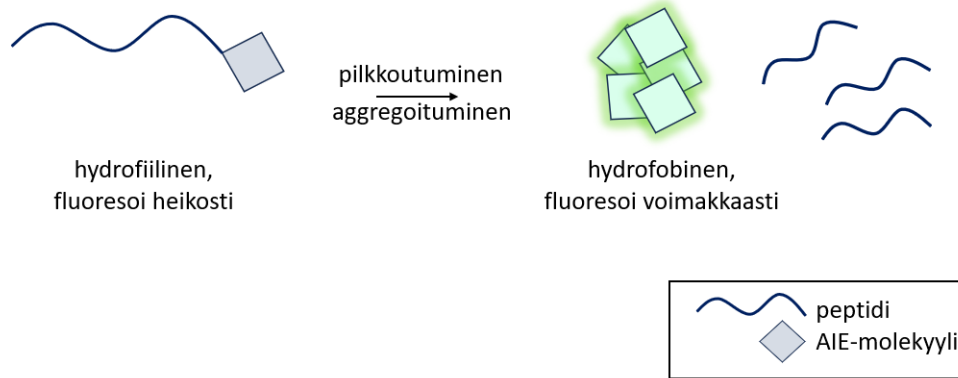
Karasawa *et al.* puolestaan vertailivat sinivihreän (MiCy) ja oranssin (mKO) fluoresoivan proteiinin muodostamaa FRET-paria yleisemmin käytettyyn sinivihreä-keltainen-pariin (CFP-YFP). Tutkimuksessa käytetty sinivihreä fluoresoiva proteiini saatiin *Acropora sp.* -lajista, ja oranssi fluoresoiva proteiini *Fungia concinna* -lajista. FRET-koettimet rakennettiin yhdistämällä fluoresoivat proteiinit aminohappoketjulla, joka sisälsi DEVD-tunnistussekvenssin. Tutkimuksessa todettiin, että MiCy ja mKO toimivat hyvin FRET-parina ja että koetin on spesifinen kaspaasi-3:n detektointiin. Havaittiin myös, että MiCy-mKO-pari

kestää pH:n muutoksia paremmin kuin CFP-YFP-pari. CFP-YFP-parilla FRET-ilmiö häiriintyy pH:n laskiessa alle 6,5:n. pH:n vaihtelun hyvä kestävyys on tehokkaan kaspasiaktiivisuuden detektoinnin kannalta tärkeää, koska metabolinen stressi solun sisällä saattaa aiheuttaa sytosolin happamoitumista. Lisäksi todettiin vielä, että CFP-YFP-parilla donorin ja akseptorin emissiospektrit ovat enemmän päällekkäin, jolloin niiden erottaminen toisistaan voi olla vaikeampaa. MiCy-mKO-parilla puolestaan emissiospektrien päällekkäisyys on vähäisempi, joten ne ovat helpommin erotettavissa. [18]

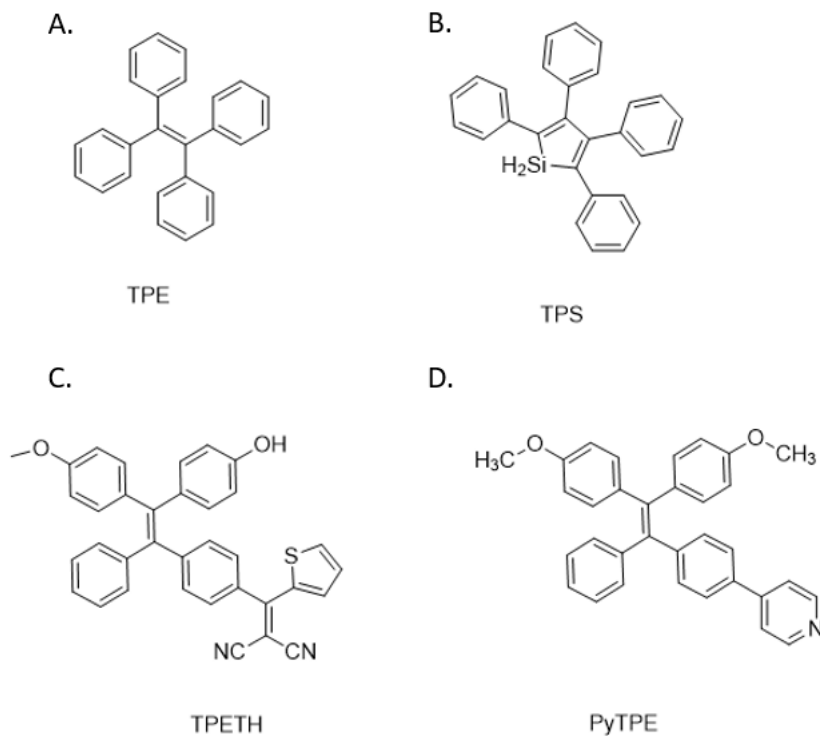
Toimeenpanijakaspasien, erityisesti kaspasi-3 ja -7:n, aktiivisuuden havainnointiin Bullok *et al.* kehittivät TcapQ₆₄₇-FRET-koettimen. Donorina koettimessa on Alexa Fluor 647 -fluorofori ja sammuttaja-akseptorina QSY21-väriaine, jotka on niin ikään yhdistetty DEVD-tunnistussekvenssin sisältävällä peptidiketjulla. TcapQ₆₄₇-koettimessa on myös niin kutsuttu Tat-peptidi, jonka tarkoituksena on mahdollistaa koettimen pääsy tehokkaasti solukalvon läpi. Alexa Fluor 647 ja QSY21 -yhdistelmän hyötynä on matala taustakohina, korkea spesifisyys ja vahva signaali. Tutkimuksessa todettiin koettimen olevan spesifi nimenomaan kaspasi-3:lle ja -7:lle, ja sen kanssa ei voinut havaita (aloitteentekijä)kaspasi-9:n aktivaatiota. Lisäksi koettimen emissio on kaukopunaisen alueella (yli 650 nm) eli se ei sekoitu mitattavien solujen autofluoresenssin kanssa esimerkiksi virtausytometriamittauksissa. [19]

3.2 Aggregaation aiheuttamaan emissioon perustuvat menetelmät

Aggregaation aiheuttama emissio (engl aggregation-induced emission, AIE) on ilmiö, jossa fluoresoivan molekyylin aggregoituminen eli kasautuminen aiheuttaa emission. Liuoksessa olevan AIE-molekyylin luminesenssin teho on hyvin vähäistä, jopa olematonta. [20] Ilmiö perustuu molekyylin sisäisen liikkeen, kuten rotaation ja vibraation, estymiseen. Aggregoituneet molekyylit estävät toisiaan liikkumasta, mikä johtaa fluoresenssin kasvuun. Liuotuksessa olevat virittyneet molekyylit puolestaan pääsevät liikkumaan vapaasti, jolloin fluoresenssia ei synny tai se on vähäistä. [21] Molekyylin viritystila siis relaxoituu molekyylin sisäisen liikkeen kautta. Tutkimuskohteesta riippuen AIE-koettimen toiminta voi perustua esimerkiksi elektrostaattisiin vuorovaikutuksiin, vetysidoksiin, hydrofobisiin vuorovaikutuksiin tai liukoisuuden muutokseen. [22] Proteaasien havainnointia varten AIE-koettimessa on peptidi, jonka proteaasi voi tunnistaa ja pilkkoa. Pilkkoutuminen johtaa lopulta AIE-molekyylien aggregaatioon ja siten fluoresenssiin. [23] AIE-koettimen toimintaperiaate on esitelty kuvassa 3.



Kuva 3. AIE-koettimen toimintaperiaate. Koettimen ollessa vapaana liuoksessa fluoresenssi on heikkoa. Kaspaasin pilkkoessa peptidin hydrofobiset AIE-molekyylit pääsevät aggregoitumaan ja fluoresenssin intensiteetti kasvaa. Mukailtu artikkelista [22].



Kuva 4. AIE-molekyylejä.

Tutkimuksessaan Han *et al.* käyttivät koettimessa tetrafenyylieteeniä (TPE) (kuva 4A) kaspaasi-3:n aktivaation havaitsemiseksi. Koettimessa oli kaspaasi-3:lle spesifi DEVD-tunnistusekvenssi. Tutkimuksessa vertailtiin koettimen kahta eri versiota. Toisessa oli TPE:n ja tunnistusekvenssin välissä pelkkä lysiini (TPE-K), kun taas toisessa oli vastaavassa kohdassa glysiini-fenyyialaniini-fenyyialaniini-tyrosiini-lysiini-peptidi (TPE-GFFYK). Kun kaspaasi aktivoituu, se pilkkoo koettimen tunnistusekvenssin kohdalta. Jäljelle jäävät

hydrofiilinen DEVD-sekvenssi ja hydrofobinen TPE:n sisältävä sekvenssi. Hydrofobiset osat hakeutuvat toistensa lähelle, ja muodostavat fluoresoivan aggregaatin (kuva 3) Tutkimuksessa havaittiin, että GFFYK-sekvenssin sisältävä koetin on herkempi kuin pelkän lysiinin sisältävä koetin. GFFYK-sekvenssi antaa koettimelle ns. itsekokoontuvan ominaisuuden, eli aggregoitua koettimet järjestäytyvät tasaisemmin verrattuna pelkän lysiinin sisältämiin koettimiin. Kun aggregaatti on tasaisemmin järjestäytynyt, on tetrafenyylieteenin molekyylin sisäiset rotaatiot tehokkaammin estetty. Tämä aiheuttaa tehokkaampaa fluoresenssia. Koettimien herkkyyttä mitattiin lineaarisella alueella 0—70 pM. Pelkän lysiinin sisältävän koettimen havaintorajaksi raportoitiin 3,5 pM ja GFFYK-sekvenssin sisältävälle koettimelle puolestaan 0,54 pM. Näin matalat havaintorajat lienevät kuitenkin kyseenalaisia raportoidun datan perusteella. [24]

Tetrafenyylieteeniä on käytetty myös spesifisesti kaspasi-6:n aktivaation havainnointiin. Spesifisyys saavutetaan käyttämällä koettimessa EVEID-tunnistusekvenssiä, joka on spesifi vain kaspasi-6:lle. Aiemmin on tiedetty, että kaspasi-6 pilkkoo proteiineja neljä aminohappoa pitkän VEID-sekvenssin jälkeen. Tutkimuksessaan Groborz *et al.* vertailivat mahdollisuuksia lisätä viides aminohappo tunnistusekvenssiin, tavoitteenaan parantaa spesifisyyttä. Tutkimuksessa havaittiin, että glutamiinihapon lisääminen sekvenssiin parantaa kaspasi-6:n katalyyttistä tehokkuutta ja substraattien selektiivisyyttä. Tutkimuksessa vertailtiin myös kaspasi-3:a ja kaspasi-6:a sekä niille tyypillisiä tunnistusekvenssejä. Todettiin, että yhdistämällä tietty selektiivinen tunnistusekvenssi AIE-molekyyliin, on mahdollista kohdentaa aktiivisuuden havainnointi spesifisesti tiettyyn kaspasiin. [25]

Myös tetrafenyylisilyyliä (engl. tetraphenylsilole, TPS) (kuva 4B) on käytetty kaspasi-3:n ja kaspasi-7:n detektointiin syöpäsoluissa. Tetrafenyylisilyyliin on konjugoitu toiselle puolelle asetyloitu DEVD-sekvenssi, ja toiselle puolelle syklinen arginiini-glysiini-asparagiinihappopeptidi (cRGD). Syklisellä RGD-peptidillä tiedetään olevan korkea affiniteetti integrini $\alpha_v\beta_3$ -reseptoriin, joka on usein yliedustettuna syöpäsoluissa. Affiniteetin vuoksi koetin pääsee todennäköisemmin sisään juuri syöpäsoluun, eikä terveeseen soluun. Näin voidaan havainnoida apoptoosia ja kaspasiin aktiivisuutta reaaliajassa syöpäsoluissa. [26]

Lin *et al.* havainnoivat kaspasi-1:n aktiivisuutta tetrafenyylieteeni-tiofeenin (engl. tetraphenylethylene-thiophene, TPETH-2OMe) (kuva 4C) avulla. AIE-molekyyliin lisättiin kaksi DDYVADC-peptidiä, jotka toimivat tunnistusekvenssinä kaspasille. Kahden peptidin lisääminen yhden sijasta todettiin madaltavan taustasignaalia. [27] Kaspasi-1:ä on havainnoitu

myös pyridiini-tetrafenyylieteenin (PyTPE) (kuva 4D) sisältävällä koettimella bakteerin infektoimassa makrofagissa. Koettimessa on AIE-molekyylisiin konjugoitu NEAYVHDAP-peptidi, jonka kaspasi-1 voi tunnistaa ja pilkkoa. [28]

Yuan *et al.* esittävät tutkimuksessaan tavan havainnoida kaspasien reaktioketjua yhdellä koettimella apoptoosin aikana. Koettimessa AIE-molekyyleinä ovat TPETH ja TPS, jotka on yhdistetty DVEDIETD-peptidillä. Peptidi sisältää kaspasi-8:n ja kaspasi-3:n tunnistussekvenssit. TPS-molekyyli on kiinni kaspasi-8:n IETD-tunnistussekvenssissä, ja TPETH-molekyyli puolestaan kaspasi-3:n DEVD-sekvenssissä. TPS-molekyylin emissio on virheää, aallonpituudella 505—525 nm, ja TPETH:n punaista, aallonpituudella 650 nm. Ne voidaan siis helposti erottaa toisistaan. Molemmat AIE-molekyylit voidaan virittää aallonpituudella 405 nm. Tutkimuksessa käsiteltiin HeLa-soluja koettimella ja vetyperoksidilla, joka indusoi apoptoosin. Havaittiin, että ensin aktivoitui kaspasi-8, jolloin emittoitui vihreää fluoresenssia. Noin 15 minuutin kuluttua havaittiin punaista fluoresenssia. Todettiin, että kaspasi-3 on aktivoitunut, ja että kaspasi-8 aktivoi sen. Tutkimuksessa tutkittiin samalla periaatteella rakennettua koetinta myös kaspasi-9:n ja kaspasi-3:n yhdistelmälle. Koettimessa oli samat AIE-molekyylit, mutta tunnistussekvenssinä käytettiin DVEDLEHD-peptidiä. Koettimella saatiin samanlaisia tuloksia kuin ensimmäiselläkin versiolla, ja todettiin koettimen mallin olevan ns. geneerinen. [29]

3.3 Kultananopartikkelit

Kultananopartikkeleita voidaan käyttää kaspasien aktiivisuuden havainnoinnissa fluoresenssin sammuttajana FRET-parissa.[4], [15] Lokalisoidun pinta-plasmoniresonanssinsa vuoksi kultananopartikkelit absorboivat vahvasti näkyvää valoa.[15] Kultananopartikkeliin pinta on helposti muokattavissa esimerkiksi erilaisilla biomolekyyleillä, mikä helpottaa spesifisyyttä. Kun spesifisyys on korkea, vältetään väriin molekyyleihin sitoutuminen ja ns. väärät positiiviset tulokset. Erilaisten synteesimenetelmien ansiosta on mahdollista kehittää erimuotoisia ja -kokoisia nanopartikkeleita. Kultananopartikkeliin absorbanssi on verrannollinen sen muotoon ja kokoon. [30]

Kultananopartikkeleita on käytetty kaspasi-3:n aktiivisuuden havainnointiin yhdistämällä kultananopartikkeliin lähi-infrapunaväriaine Cy5.5. Kultananopartikkeli toimii havainnointireaktiossa siis Cy5.5:n fluoresenssin sammuttajana. Väriaine yhdistetään partikkeliin linkkerillä, jossa on 3,4-dihydroksi-fenyylialaniiniryhmiä (DOPA) ja kaspasi-3:lle ominainen DEVD-sekvenssi. DOPA-molekyyleillä on hyvä tarttuvuus epäorgaanisiin

pintoihin, ja niiden käyttö linkkerissä tekee koettimesta hyvin stabiilin. Linkkereillä päällystetyt kultananopartikkelit eivät pääse aggregoitumaan solun sytosolissa. On havaittu, että koettimella on mahdollista detektoida kaspasi-3:n aktiivisuutta ja näin ollen myös apoptoosia reaaliajassa. Fluoresenssi alkaa näytteessä noin 10 minuutin kuluessa siitä, kun näytteeseen on lisätty aktiivinen kaspasi-3. [31]

Chen *et al.* kehittivät monitoimisen kultananopartikkelin, jonka avulla on mahdollista sekä käynnistää apoptoosi syöpäsolussa että havainnoida sen etenemistä reaaliajassa. Koettimessa käytettiin rodamiini B-konjugoitua peptidiä, jossa oli myös DEVD-sekvenssi. Rodamiini B toimii fluoresoivana väriaineena, ja kultananopartikkeli sammuttaa sen fluoresenssin. Koettimessa oli myös apoptoosin indusoiva DTP-peptidi (engl. dual-targeting pro-apoptotic peptide), joka koostui trifenyylifosfoniumista, $D(KLAKLAK)_2$ -peptidistä ja folaattiosasta. Folaattiosa auttaa koettimen endosytoosissa, sillä syöpäsoluilla on usein yllidustettuna folaattireseptoreita. Koettimen päätyessä soluun se aiheuttaa mitokondrion toimintahäiriön, mikä puolestaan käynnistää apoptoosin. Apoptoosin edetessä kaspasi-3 aktivoituu, joka havaitaan rodamiini B:n fluoresenssina kaspasiin pilkkoessa DEVD-sekvenssin. [32]

Myös fluoresoivia proteiineja on käytetty FRET-parissa kultananopartikkelin kanssa. Park *et al.* konjugoivat tutkimuksessaan keltaisen, sinisen ja punaisen fluoresoivan proteiinin kultananopartikkeliin kaspasi-3:n, -8:n ja -9:n tunnistussekvenssit sisältävillä linkkereillä. Jokainen fluoresoiva proteiini kiinnitettiin partikkeliin omalla linkkerillään, jotta kaspasiin aktivoitumista voitiin seurata fluoresenssin aallonpituuden perusteella reaaliajassa. Kultananopartikkelin hyöty FRET-parissa sammuttajana on sen laaja sammutusspektri. Donorin emissiospektrillä ei ole siis niin suurta merkitystä, sillä kultananopartikkeli on hyvin vahva sammuttaja laajalla spektrialueella. Tämän ansiosta voidaan rakentaa yksi koetin, jolla voidaan havainnoida kolmen eri proteaasin aktiivisuutta samanaikaisesti. [33]

Fluoreskeiini-isotiosyanaattia (FITC) on myös käytetty kultananopartikkelin kanssa kaspasi-3:n aktiivisuuden havainnoinnissa. Tutkimuksessaan Hu *et al.* kapseloivat koettimen solukalvon sisään. Koettimen päällystäminen solukalvolla paransi koettimen stabiiliteettia ja tehosti kuljetusta haluttuun kohteeseen. Verrattuna päällystämättömiin koettimiin, fluoresenssin intensiteetti oli päällystetyillä koettimilla 1,8-kertainen. Tämän arvellaan johtuvan juurikin tehokkaammasta siirtymisestä solun sisään. [34]

Wang *et al.* tutkivat kumariinia (coumarin 343) donorina FRET-parissa yhdistettynä kultananopartikkeliin. Tutkimuksessa vertailtiin peptidilinkkerin pituuden vaikutusta

sammutukseen, ja peptidin pilkkomisen jälkeiseen fluoresenssin intensiteettiin. Käytetyt peptidit olivat kuuden ja yhdeksän aminohapon pituisia, ja sisälsivät DEVD-sekvenssin. Tutkimuksessa havaittiin, että lyhyempi sekvenssi aiheuttaa tehokkaamman sammutuksen kumariinin ja kultananopartikkelin välillä, joten fluoresenssin palautuminen peptidin pilkkomisen jälkeen oli paremmin havaittavissa. Tutkimuksessa todettiin kuusi aminohappoa sisältävän koettimen olevan spesifisempi ja herkempi kaspasi-3:lle kuin yhdeksän aminohapon koettimen. [35]

Kultananopartikkelin ja fluoreskeiini-isotiosyanaatin sisältävän koettimen herkkyyttä on yritetty parantaa yhdistämällä ne peptidilinkkerin lisäksi yksinauhaisella DNA:lla. Peptidin pilkkoutuessa, donori ja akseptori joutuvat noin 7 nm etäisyydelle, mutta eivät eroa kokonaan DNA:n kiinnittäessä ne toisiinsa. Tekniikka perustuu ns. metallilla tehostettuun fluoresenssiin (engl. metal enhanced fluorescence, MEF). Fluoresenssin intensiteetti kasvaa huomattavasti fluoroforin ollessa sopivalla etäisyydellä kultananopartikkelista. Tutkimuksessaan Choi *et al.* vertailivat fluoresenssin intensiteettiä koettimilla, joista toisella oli vain peptidilinkkeri, ja toisella sekä peptidilinkkeri että yksinauhainen DNA. Kaspasi-3:a havainnoivan koettimen herkkyyttä mitattiin lineaarisella alueella 0,01—10 ng/ml (noin 0,006—0,6 nM) ja havaintorajaksi raportoitiin 0,01 ng/ml. [36]

3.4 Kvanttipisteet

Kvanttipisteet ovat fluoresoivia ja nanokokoisia puolijohdepartikkeleita ja halkaisijaltaan noin 2—10 nm. Niiden hyötyjä ovat esimerkiksi hyvä stabiilisuus, viritysalueen laajuus ja kirkkaus. Kvanttipiste voi olla 10—20 kertaa kirkkaampi kuin orgaaninen fluoresoiva väriaine. Lisäksi ne ovat inerttejä ja niiden pintaa voidaan käsitellä eri tavoin. Näin kvanttipisteistä saadaan soveltuvampia biologisiin systeemeihin. Biokuvantamisessa käytetyt kvanttipisteet ovat materiaaliltaan usein sinkin ja rikin tai kadmiumin ja telluurin yhdistelmiä. [37] Kvanttipisteiden etuna on niiden koon verrannollisuus emissiospektriin. Pienemmät partikkelit emittoivat korkeaenergisempää eli sinisempää, ja isommat matalaenergisempää eli punaisempää, fluoresenssia. [38] Kvanttipisteet ovat hyvä vaihtoehto orgaanisille väriaineille, joilla on hyvin tarkat viritysaallonpituudet. Kvanttipisteillä sen sijaan on laajempi viritysspektri. [39] Proteaasien havainnoinnissa kvanttipisteitä on käytetty FRET-parin donorina [40].

Kultananopartikkeliä on käytetty FRET-parissa kvanttipisteen kanssa useassa tutkimuksessa. Asetelmassa kvanttipiste on toiminut donorina ja kultananopartikkeli puolestaan akseptorina.

[41], [42] Kvanttipisteen ja kultananopartikkelin yhdistämisen etuna on esimerkiksi kultananopartikkelin laaja absorptiospektri. Se voidaan siis yhdistää erilaisten kvanttipisteiden kanssa, joiden emissiospektrit eroavat toisistaan. Tämä mahdollistaa rinnakkaiset määritykset, eli voidaan samanaikaisesti havainnoida useampaa proteaasia kerralla.[42]

Kim *et al.* tutkivat kultananopartikkelista ja kvanttipisteestä koostuvaa FRET-koetinta lasilevyllä. Tutkimuksessa myös vertailtiin Cy5-väriaineen käyttöä akseptorina kultananopartikkelin sijaan. Tutkimuksessa kvanttipisteeseen konjugoitiin sopivat peptidit kaspasi-3:n mittaamiseksi, ja peptidien päässä oli kultananopartikkeli. Havaittiin, että kultananopartikkeli on Cy5-väriainetta vahvempi sammuttaja. Kultananopartikkelin ja kvanttipisteen välinen energiansiirto oli tehokkaampaa kuin Cy5-väriaineen ja kvanttipisteen välinen. Kultananopartikkeli on siis tehokkaampi fluoresenssin sammuttaja kuin Cy5-väriaine. [42]

Procházková *et al.* tutkivat kaspasi-3:n ja -7:n havainnointia kvanttipisteestä ja BHQ-2-sammuttajasta koostuvalla FRET-koettimella. Kvanttipisteen ydin koostui kadmiumin ja telluurin yhdistelmästä, ja se oli päällystetty karboksyylihapporyhmillä. Tutkimuksessa luotua koetinta verrattiin kaupalliseen Magic Red®-koettimeen. Havaittiin, että kvanttipistekoettimen fluoresenssin intensiteetti ja stabiilisuus olivat parempia kuin kaupallisella koettimella. Tutkimuksessa kehitetyn koettimen fluoresenssi kesti ainakin 14 päivää. [43]

Myös niin kutsuttua ”mCherry” fluoresoivaa proteiinia on hyödynnetty fluoresenssin sammuttajana FRET-koettimessa kvanttipisteen kanssa. Tutkimuksessa havainnoitiin kaspasi-3:n aktiivisuutta. [44] Kaspasi-1:n aktiivisuutta on puolestaan havainnoitu kvanttipisteen ja Cy3-väriaineen avulla. [45]

3.5 Grafeenioksidi

Grafeenioksidi on grafeenin hapettunut versio, ja sitä käytetään fluoresenssin sammuttajana biokuvantamisessa. Sen hyötyjä ovat optinen läpinäkyvyys, joustavuus ja hyvä yhteensopivuus soluissa. Lisäksi etuna on sen suuri pinta-alan ja tilavuuden suhde. Se on myös hyvin muokattavissa. Grafeenioksidilevyissä on paljon happipohjaisia funktionaalisia ryhmiä, jotka parantavat esimerkiksi vesiliukoisuutta, reaktiivisuutta ja mahdollisuutta muodostaa kovalenttisia sidoksia biomolekyylien kanssa. Molekyylit tarttuvat grafeenioksidin pintaan π - π -pinoutumisen kautta. Kultananopartikkelin tavoin grafeenioksidilla on laaja absorptiospektri, noin 300—700 nm välillä. Grafeenioksidi on hyvin vahva sammuttaja. FRET-koettimessa donorin ja grafeenioksidin välimatka voi olla jopa 30 nm. [46]

Tao *et al.* tutkivat pelkistettyä grafeenioksidia kaspasii-8:n havainnoinnissa. Tutkimuksessa konjugoitiin kaspasii-8:n tunnistussekvenssin sisältävä peptidi ja tetrametyylirodamiini-väriaine grafeenioksidilevyyn. Kaspaasin aktivoituessa grafeenioksidin aiheuttama sammutus loppuu, mikä aiheuttaa fluoresenssia aallonpituudella 576 nm. [47]

Liu *et al.* puolestaan havainnoivat samanaikaisesti kaspasii-3:n ja sytokromi C:n aktiivisuutta. Koettimessa on Cy5:llä leimattu DNA-aptameeri ja fluoreseiiniamidiitilla (FAM) leimattu peptidi, joka sisältää kaspasii-3:n tunnistussekvenssin. Apoptoosin käynnistyessä, sytokromi C:tä vapautuu mitokondriosta, jolloin DNA-aptameeri voi sitoutua siihen, ja irrota grafeenioksidilevystä. Irtoaminen aiheuttaa punaista fluoresenssia aallonpituudella 664 nm. Sytokromi c:n vapautuminen puolestaan aktivoi kaspaasin, jolloin kaspasii pilkkoo FAM-leimatun peptidin. Tämä aiheuttaa vihreää fluoresenssia aallonpituudella 525 nm. [48] Wang *et al.* mittasivat niin ikään kaspasii-3:a FAM-leimatun peptidin avulla. Tutkimuksessa herkkyttä mitattiin lineaarisella alueella 7,25—362 ng/ml, eli noin 0,4—20 nM. Tämän perusteella havaintorajaksi raportoitiin 7,25 ng/ml eli 0,4 nM.[49]

Ren *et al.* tutkivat apoptoosin säätelyä havainnoimalla samanaikaisesti MiRNA:ta ja kaspasii-3:a kaksivärisellä fluoresoivalla nanosensorilla. Tutkimuksessa grafeenioksidiin konjugoitiin molekyyliimerkki (engl. molecular beacon, MB) leimattuna Cy-5-väriaineella ja peptidi leimattuna FITC-väriaineella. Molekyyliimerkillä havainnoitiin MiRNA:ta ja peptidillä kaspasii-3:a. Tarkoituksena oli havainnoida kaspaasin aktivoitumista ja MiRNA:n sitoutumista molekyyliimerkkiin fluoresenssin intensiteetin kasvua seuraamalla. Grafeenioksidi toimii siis väriaineiden fluoresenssin sammuttajana. Tutkittiin myös koettimen pH:n kestävyttä ja stabiiliutta. Todettiin koettimen kestävän vain biologisia olosuhteita ja olevan epästabiili emäksisissä olosuhteissa. Optimaalinen käyttöolosuhde koettimelle oli pH 7,4. [50]

3.6 Fluorokromeilla leimatut inhibiittorit

Kaspaasien aktiivisuutta voidaan mitata fluorokromeilla leimattujen inhibiittorien avulla, käyttäen fluoresenssispektroskopiaa ja -mikroskopiaa sekä virtaussytometriä. Näitä koettimia voidaan siis helposti havainnoida myös esimerkiksi monileimalukijalla. [51] Koettimissa käytetään sopivaa peptidiä riippuen havainnoinnin kohteesta. Mikäli halutaan yleisesti mitata kaspaaseja, voidaan käyttää peptidinä VAD-sekvenssiä, joka ei ole spesifi vain yksittäisille kaspaaseille. Peptidinä voidaan käyttää myös tietyille kaspaaseille spesifejä sekvenssejä.

Peptidin karboksyyli-terminaalipäähän konjugoidaan elektrofiilinen ns. kärki (engl. warhead), joka sitoutuu kovalenttisesti kaspaasin aktiivisen keskuksen kysteiinisivuketjuun, ja tarkemmin

kysteiniin tioliryhmään. Kärki toimii aktiivisen kaspasiin inhibiittorina. Koettimen aminotermiinalipäässä on fluoresoiva leima, jota voidaan havainnoida. Fluoresoivina väriaineina koettimisessa voidaan käyttää esimerkiksi karboksifluoreskeiinia (FAM), fluoreskeiini-isotiosyanaattia, Cy5:ä tai sulforodamiini B:tä. [52] Kärkinä voidaan puolestaan käyttää fluorometyyliketoneita (FMK) tai asyylioksimetyyliketoneita (AOMK).

Fluorokromeilla leimattujen inhibiittorikoettimien haasteena on, että niistä voi puuttua selektiivisyys yksittäisiin kaspaseihin. Koettimet voivat kohdentua muihinkin kysteiniiproteaaseihin, kuten katepsiineihin, koska AOMK ja FMK hakeutuvat kysteiniin tioliryhmään. Ne eivät siis ole spesifejä ainoastaan kaspasiin kysteiniinille, eikä sopiva peptidisekvenssikään aina paranna spesifisyyttä. Haasteena on myös epäspesifisestä sitoutumisesta johtuva korkea taustafluoresenssi. [53] AOMK on vähemmän reaktiivinen kuin FMK, joten sen käyttö ei aiheuta niin korkeaa taustafluoresenssia [54].

Tutkimuksessaan Vickers *et al.* kehittivät inhibiittorikoettimen, jolla voidaan erottaa kaspasi-3 kaspasi-7:stä. Vertailukohtana käytettiin FAM-DEVD-AOMK -koetinta. Uudessa koettimessa peptidisekvenssissä käytettiin ns. epäluonnollisia aminohappoja, ja sekvenssi oli: 3-pyridiylialaniini, asparagiinihappo, β -homoleusiini, homoleusiini, asparagiinihappo (CV3). Tutkimuksessa vertailtiin DEVD- ja CV3-sekvenssit sisältävien koettimien sitoutumista kaspasi-3:een, -6:een, -7:ään, -8:aan ja -9:ään. FAM-DEVD-AOMK -koettimella konsentraatiot, jossa 50% reaktioista estyy (IC_{50} -arvo), olivat kaspasi-3:lla, -6:lla, -7:llä ja -8:lla vaihdellen 18-29 nM. Kaspasi-9:llä arvo oli 1100 nM. DEVD-sekvenssillä siis muut paitsi kaspasi-9 inhiboituivat yhtä tehokkaasti. FAM-CV3-AOMK -koettimella puolestaan vain kaspasi-3:lla arvo oli alhainen, 27 nM. Muilla mitatuilla kaspaseilla se oli huomattavasti korkeampi, eli inhibitio oli heikompaa. Kaspasi-7:ään verrattuna CV3-sekvenssin sisältävä koetin inhiboi kaspasi-3:n 48 kertaa alhaisemmassa pitoisuudessa. Kaspasi-3 voidaan siis kyseisellä koettimella selkeästi erottaa kaspasi-7:stä, koska koetin sitoutuu tehokkaammin kaspasi-3:een. [51]

4 Menetelmien vertailua

Kaspasiin aktiivisuuden havainnointiin käytettäviä menetelmiä vertailtaessa nanomateriaaleista koostetut FRET-koettimet vaikuttavat tehokkaimmilla. FRET-koettimissa spesifisyyttä parantaa koettimen linkkeriosa, joka sisältää mitattavan kaspasiin tunnistussekvenssin. Fluoresenssin intensiteetin muutos havaitaan vain, jos tietty kaspasi pilkkoo linkkerin.

Kultananopartikkelien etuja ovat sen laaja sammutusspektri, muokkautuvuus ja myrkyttömyys. Kultananopartikkelin kanssa voidaan käyttää useita erilaisia donoreita FRET-parissa juurikin sen laajan sammutusspektrin ansiosta. Lisäksi sen pinta on hyvin muokattavissa, ja siihen voidaan konjugoida esimerkiksi erilaisia biomolekyylejä parantamaan spesifisyyttä. Pintaan voidaan liittää myös useampia fluoroforeja erilaisilla linkkereillä, jotta yhdellä koettimella voidaan mitata useampaa eri kaspaaasia samanaikaisesti.

Kvanttipisteitä puolestaan käytetään FRET-pareissa donoreina. Kvanttipisteiden etuja ovat kirkkaus, stabiilisuus ja hyvä muokattavuus. Lisäksi niillä on laaja virityspektri, ja niiden emissiospektri on verrannollinen niiden kokoon. Heikkoutena on niiden myrkyllisyys, eikä niitä voida siis käyttää elävissä soluissa pitkäaikaisesti. Kvanttipiste voi itsessään indusoida apoptoosin elävässä solussa [43]. *In vitro* -mittauksissa tämä ei toisaalta ole niinkään suuri ongelma.

Fluoresoivien proteiinien käytössä FRET-parissa donori- ja akseptorimolekyylit tulee valita tarkasti ottaen huomioon niiden viritys- ja emissiospektrit. Tärkeää on, että donorin ja akseptorin emissiospektrit eivät saa molemmat olla liian päällekkäiset, sillä niiden erottaminen toisistaan vaikeutuu. Hyviä vaihtoehtoja ovat esimerkiksi keltainen-punainen- ja vihreä-punainen-parit. Fluoresoivien proteiinien käytössä tulee huomioida myös proteiinien pH:n kestävyys. Nanomateriaaleja käytettäessä tällaisia ongelmia ei sen sijaan ole.

Kultananopartikkelin tavoin grafeenioksidi on vahva sammuttaja FRET-parissa, ja sen absorptiospektri on laaja. Grafeenioksidi on myös hyvin muokattavissa, ja sillä on hyvä yhteensopivuus biologisiin ympäristöihin. Grafeenioksidin pintaan voidaan konjugoida monia erilaisia biomolekyylejä, mikä mahdollistaa useamman havainnoinnin kohteen samanaikaisesti.

AIE-koettimien etuja ovat niiden hyvä spesifisyys tiettyihin kaspaseihin niiden sisältämien tunnustussekvenssien vuoksi. Spesifisyyttä parantaa FRET-koettimien tavoin kaspasiin mahdollisuus pilkkoa koettimen sisältämä linkkeriosa, jolloin voidaan havainnoida vain haluttua kaspaaasia. Aggregoitua koettimen molekyylin fluoresenssin intensiteetti kasvaa huomattavasti.

Fluorokromeilla leimatut inhibiittorit eroavat muista koettimista siinä, että niiden toiminta ei perustu peptidin pilkkoutumiseen. Aktivaatio sen sijaan havaitaan fluoresoivan koettimen sitoutumisesta kaspasiin aktiiviseen keskukseen. Leimattujen inhibiittorien heikkous on niiden huono spesifisyys tiettyyn kaspasiin, mutta niillä on mahdollista havainnoida yleisesti

kaspaasien aktivoitumista ja siten esimerkiksi apoptoosin etenemistä. Etuja puolestaan on niiden käytön helppous, ja mittauksia voidaan tehdä yksinkertaisesti esimerkiksi monileimalukijalla.

5 Johtopäätökset

Fluoresenssiin perustuvat kaspaasien aktiivisuutta havainnoivat menetelmät hyödyntävät pääasiassa proteiinien pilkkoutumista mutta myös inhibiittorin sitoutumista. Eri menetelmien vertailusta haastavaa kuitenkin tekee herkkyysmittauksien puuttuminen tai niiden vaikeaselkoisuus.

Proteiinien pilkkoutumiseen perustuvista havainnointimenetelmistä hyödyllisin ja käytetyin lienee Försterin resonanssienergiansiirto, jossa voidaan soveltaa useita erilaisia donori-akseptori-pareja mittauksen tavoitteesta riippuen. Herkimmät ja monikäyttöisimmät FRET-parit koostuvat nanomateriaaleista, kuten kultananopartikkeleista, grafeenioksidista tai kvanttipisteistä. Sopivia pareja yhdistelemällä voidaan havainnoida useampia kaspaaseja samanaikaisesti. Ongelmana on vielä kuitenkin joidenkin kaspaasien yhtenevät tai erityisen samankaltaiset tunnistussekvenssit, jotka vaikeuttavat niiden erottamista toisistaan.

Kaspaasien havainnointiin on jossain määrin hyödynnetty myös aggregaation aiheuttamaan emissioon pohjautuvia koettimia. AIE-koettimet ovat kehityskelpoisia niiden hyvän herkkyuden ja spesifisyyden vuoksi. Inhibiittorin sitoutumiseen perustuvia menetelmiä ei sen sijaan ole vielä tutkittu yhtä laajasti kuin pilkkoutumiseen perustuvia menetelmiä. Näitä niin kutsuttuja suoria menetelmiä tulisi myös kehittää tarkemmaksi, jotta voitaisiin paremmin erottaa yksittäisiä kaspaaseja toisistaan. Haasteena on myös kaspaasi-inhibiittorien sitoutuminen muihinkin kysteiiniproteaaseihin.

6 Lähteet

- [1] D. R. McIlwain, T. Berger, and T. W. Mak, 'Caspase functions in cell death and disease', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 5, no. 4, pp. 1–28, Apr. 2013, doi: 10.1101/cshperspect.a008656.
- [2] S. J. Riedl and G. S. Salvesen, 'The apoptosome: Signalling platform of cell death', *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 8, no. 5, pp. 405–413, May 2007, doi: 10.1038/nrm2153.
- [3] B. Bibo-Verdugo and G. S. Salvesen, 'Caspase mechanisms in the regulation of inflammation', *Mol Aspects Med*, vol. 88, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.mam.2022.101085.
- [4] B. Hu, S. Gao, X. Han, and C. Ding, 'Recent advances in fluorescence biosensor for caspase detecting and imaging in biomedical applications', *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, vol. 168, Nov. 2023, doi: 10.1016/j.trac.2023.117337.
- [5] S. Dhani, Y. Zhao, and B. Zhivotovsky, 'A long way to go: caspase inhibitors in clinical use', *Cell Death Dis*, vol. 12, no. 10, Oct. 2021, doi: 10.1038/s41419-021-04240-3.
- [6] D. Bertheloot, E. Latz, and B. S. Franklin, 'Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death', *Cell Mol Immunol*, vol. 18, no. 5, pp. 1106–1121, May 2021, doi: 10.1038/s41423-020-00630-3.

- [7] S. M. Srinivasula, M. Ahmad, T. Fernandes-Alnemri, and E. S. Alnemri, 'Autoactivation of Procaspase-9 by Apaf-1-Mediated Oligomerization', *Mol Cell*, vol. 1, no. 7, pp. 949–957, 1998, doi: 10.1016/s1097-2765(00)80095-7.
- [8] V. Vigneswara and Z. Ahmed, 'The Role of Caspase-2 in Regulating Cell Fate', *Cells*, vol. 9, no. 5. NLM (Medline), May 19, 2020. doi: 10.3390/cells9051259.
- [9] M. Chen and J. Wang, 'Initiator caspases in apoptosis signaling pathways', *Apoptosis*, vol. 7, pp. 313–319, 2002, doi: 10.1023/a:1016167228059.
- [10] S. Bratton *et al.*, 'Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes', *EMBO J*, vol. 20, no. 5, pp. 998–1009, 2001, doi: 10.1093/emboj/20.5.998.
- [11] P. Smyth, T. Sessler, C. J. Scott, and D. B. Longley, 'FLIP(L): the pseudo-caspase', *FEBS Journal*, vol. 287, no. 19, pp. 4246–4260, Oct. 2020, doi: 10.1111/febs.15260.
- [12] O. Micheau and J. Tschopp, 'Induction of TNF Receptor I-Mediated Apoptosis via Two Sequential Signaling Complexes', *Cell*, vol. 114, pp. 181–190, 2003, doi: 10.1016/s0092-8674(03)00521-x.
- [13] Ripa Paul, Sudip Suklabaidya, and Syed Arshad Hussain, 'Fluorescence resonance energy transfer (FRET) as biomarkers', *Mater Today Proc*, vol. 46, pp. 6301–6303, 2020, doi: 10.1016/j.matpr.2020.05.217.
- [14] E. A. Jares-Erijman and T. M. Jovin, 'FRET imaging', *Nat Biotechnol*, vol. 21, no. 11, pp. 1387–1395, Nov. 2003, doi: 10.1038/nbt896.
- [15] I. L. H. Ong and K. L. Yang, 'Recent developments in protease activity assays and sensors', *Analyst*, vol. 142, no. 11, pp. 1867–1881, Jun. 2017, doi: 10.1039/c6an02647h.
- [16] K. Luo, V. Yu, Y. Pu, and D. Chang, 'Application of the Fluorescence Resonance Energy Transfer Method for Studying the Dynamics of Caspase-3 Activation during UV-Induced Apoptosis in Living HeLa Cells', *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 283, no. 5, pp. 1054–1060, 2001, doi: 10.1006/bbrc.2001.4896.
- [17] H. Kawai *et al.*, 'Simultaneous Real-Time Detection of Initiator-and Effector-Caspase Activation by Double Fluorescence Resonance Energy Transfer Analysis', *Journal of Pharmacological Sciences J Pharmacol Sci*, vol. 97, pp. 361–368, 2005, doi: 10.1254/jphs.fp0040592.
- [18] S. KARASAWA, T. ARAKI, T. NAGAI, H. MIZUNO, and A. MIYAWAKI, 'Cyan-emitting and orange-emitting fluorescent proteins as a donor/acceptor pair for fluorescence resonance energy transfer', *Biochemical Journal*, vol. 381, no. 1, pp. 307–312, Jul. 2004, doi: 10.1042/BJ20040321.
- [19] K. Bullok and D. Piwnica-Worms, 'Synthesis and characterization of a small, membrane-permeant, caspase-activatable far-red fluorescent peptide for imaging apoptosis', *J Med Chem*, vol. 48, no. 17, pp. 5404–5407, Aug. 2005, doi: 10.1021/jm050008p.
- [20] J. Guan, C. Shen, J. Peng, and J. Zheng, 'What leads to aggregation-induced emission?', *Journal of Physical Chemistry Letters*, vol. 12, no. 17, pp. 4218–4226, May 2021, doi: 10.1021/acs.jpcclett.0c03861.
- [21] Y. Wang *et al.*, 'Practicable Applications of Aggregation-Induced Emission with Biomedical Perspective', *Adv Healthc Mater*, vol. 10, no. 24, Dec. 2021, doi: 10.1002/adhm.202100945.
- [22] R. T. K. Kwok, C. W. T. Leung, J. W. Y. Lam, and B. Z. Tang, 'Biosensing by luminogens with aggregation-induced emission characteristics', *Chem Soc Rev*, vol. 44, no. 13, pp. 4228–4238, Jul. 2015, doi: 10.1039/c4cs00325j.
- [23] F. Gao, G. Liu, M. Qiao, Y. Li, and X. Yi, 'Biosensors for the Detection of Enzymes Based on Aggregation-Induced Emission', *Biosensors (Basel)*, vol. 12, no. 11, Nov. 2022, doi: 10.3390/bios12110953.
- [24] A. Han *et al.*, 'Peptide-Induced AIEgen Self-Assembly: A New Strategy to Realize Highly Sensitive Fluorescent Light-Up Probes', *Anal Chem*, vol. 88, no. 7, pp. 3872–3878, Apr. 2016, doi: 10.1021/acs.analchem.6b00023.
- [25] K. M. Groborz, M. Kalinka, J. Grzyska, S. Kołt, S. J. Snipas, and M. Poręba, 'Selective chemical reagents to investigate the role of caspase 6 in apoptosis in acute leukemia T cells', *Chem Sci*, vol. 14, no. 9, pp. 2289–2302, Jan. 2023, doi: 10.1039/d2sc05827h.
- [26] D. Ding *et al.*, 'Light-up bioprobe with aggregation-induced emission characteristics for real-time apoptosis imaging in target cancer cells', *J Mater Chem B*, vol. 2, no. 2, pp. 231–238, Jan. 2014, doi: 10.1039/c3tb21495h.
- [27] H. Lin *et al.*, 'Caspase-1 Specific Light-Up Probe with Aggregation-Induced Emission Characteristics for Inhibitor Screening of Coumarin-Originated Natural Products', *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 10, no. 15, pp. 12173–12180, Apr. 2018, doi: 10.1021/acsami.7b14845.
- [28] G. Qi, F. Hu, Kenry, L. Shi, M. Wu, and B. Liu, 'An AIEgen-Peptide Conjugate as a Phototheranostic Agent for Phagosome-Entrapped Bacteria', *Angewandte Chemie*, vol. 131, no. 45, pp. 16375–16381, Nov. 2019, doi: 10.1002/ange.201906099.

- [29] Y. Yuan, C. J. Zhang, R. T. K. Kwok, D. Mao, B. Z. Tang, and B. Liu, 'Light-up probe based on AIEgens: dual signal turn-on for caspase cascade activation monitoring', *Chem Sci*, vol. 8, no. 4, pp. 2723–2728, 2017, doi: 10.1039/c6sc04322d.
- [30] M. Swierczewska, S. Lee, and X. Chen, 'The design and application of fluorophore-gold nanoparticle activatable probes', *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 13, no. 21, pp. 9929–9941, Jun. 07, 2011. doi: 10.1039/c0cp02967j.
- [31] I. C. Sun *et al.*, 'Caspase sensitive gold nanoparticle for apoptosis imaging in live cells', *Bioconjug Chem*, vol. 21, no. 11, pp. 1939–1942, Nov. 2010, doi: 10.1021/bc1003026.
- [32] W. H. Chen *et al.*, 'Cancer-targeted functional gold nanoparticles for apoptosis induction and real-time imaging based on FRET', *Nanoscale*, vol. 6, no. 16, pp. 9531–9535, Aug. 2014, doi: 10.1039/c4nr02516d.
- [33] K. Park, J. Jeong, and B. H. Chung, 'Cascade imaging of proteolytic pathways in cancer cells using fluorescent protein-conjugated gold nanoquenchers', *Chemical Communications*, vol. 48, no. 85, pp. 10547–10549, Oct. 2012, doi: 10.1039/c2cc35687b.
- [34] X. Hu *et al.*, 'Cell membrane-coated gold nanoparticles for apoptosis imaging in living cells based on fluorescent determination', *Microchimica Acta*, vol. 187, no. 3, Mar. 2020, doi: 10.1007/s00604-020-4130-1.
- [35] Q. Wang *et al.*, 'Coumarin-modified gold nanoprobe for the sensitive detection of caspase-3', *RSC Adv*, vol. 5, no. 54, pp. 43824–43830, 2015, doi: 10.1039/c5ra05350a.
- [36] J. H. Choi and J. W. Choi, 'Metal-Enhanced Fluorescence by Bifunctional Au Nanoparticles for Highly Sensitive and Simple Detection of Proteolytic Enzyme', *Nano Lett*, vol. 20, no. 10, pp. 7100–7107, Oct. 2020, doi: 10.1021/acs.nanolett.0c02343.
- [37] B. Gidwani *et al.*, 'Quantum dots: Prospectives, toxicity, advances and applications', *J Drug Deliv Sci Technol*, vol. 61, p. 102308, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102308>.
- [38] B. R. Knudsen, M. L. Jepsen, and Y. P. Ho, 'Quantum dot-based nanosensors for diagnosis via enzyme activity measurement', *Expert Review of Molecular Diagnostics*, vol. 13, no. 4, pp. 367–375, May 2013. doi: 10.1586/erm.13.17.
- [39] D. Ozkan Vardar, S. Aydin, I. Hocaoglu, F. H. Yagci Acar, and N. Basaran, 'Effects of silver sulfide quantum dots coated with 2-mercaptopropionic acid on genotoxic and apoptotic pathways *in vitro*', *Chem Biol Interact*, vol. 291, pp. 212–219, Aug. 2018, doi: 10.1016/j.cbi.2018.06.032.
- [40] W. R. Algar and U. J. Krull, 'Quantum dots as donors in fluorescence resonance energy transfer for the bioanalysis of nucleic acids, proteins, and other biological molecules', *Anal Bioanal Chem*, vol. 391, no. 5, pp. 1609–1618, Jul. 2008, doi: 10.1007/s00216-007-1703-3.
- [41] C. Gu, 'Quantum dots-based fluorescence resonance energy transfer biosensor for monitoring cell apoptosis', *Luminescence*, vol. 32, no. 7, pp. 1186–1191, Nov. 2017, doi: 10.1002/bio.3309.
- [42] Y. P. Kim, Y. H. Oh, E. Oh, S. Ko, M. K. Han, and H. S. Kim, 'Energy transfer-based multiplexed assay of proteases by using gold nanoparticle and quantum dot conjugates on a surface', *Anal Chem*, vol. 80, no. 12, pp. 4634–4641, Jun. 2008, doi: 10.1021/ac702416e.
- [43] M. Procházková, E. Kuchovská, M. Killinger, and K. Klepárník, 'Novel Förster Resonance Energy Transfer probe with quantum dot for a long-time imaging of active caspases inside individual cells', *Anal Chim Acta*, vol. 1267, Aug. 2023, doi: 10.1016/j.aca.2023.341334.
- [44] K. Boeneman *et al.*, 'Sensing caspase 3 activity with quantum dot-fluorescent protein assemblies', *J Am Chem Soc*, vol. 131, no. 11, pp. 3828–3829, Mar. 2009, doi: 10.1021/ja809721j.
- [45] I. L. Medintz *et al.*, 'Proteolytic activity monitored by fluorescence resonance energy transfer through quantum-dot-peptide conjugates', *Nature Materials*, vol. 5, no. 7, Nature Publishing Group, pp. 581–589, 2006. doi: 10.1038/nmat1676.
- [46] A. Battisti, S. K. Samal, and D. Puppi, 'Biosensing Systems Based on Graphene Oxide Fluorescence Quenching Effect', *Micromachines*, vol. 14, no. 8. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), Aug. 01, 2023. doi: 10.3390/mi14081522.
- [47] X. Tao, W. Zou, Y. Qin, C. Tong, and B. Liu, 'Reduced graphene oxide quenched peptide probe for caspase-8 activity detection and cellular imaging', *Microchimica Acta*, vol. 189, no. 12, Dec. 2022, doi: 10.1007/s00604-022-05567-0.
- [48] C. Liu *et al.*, 'A graphene oxide nanosensor enables the co-delivery of aptamer and peptide probes for fluorescence imaging of a cascade reaction in apoptotic signaling', *Analyst*, vol. 143, no. 1, pp. 208–214, Jan. 2018, doi: 10.1039/c7an01515a.

- [49] H. Wang, Q. Zhang, X. Chu, T. Chen, J. Ge, and R. Yu, 'Graphene oxide-peptide conjugate as an intracellular protease sensor for caspase-3 activation imaging in live cells', *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 50, no. 31, pp. 7065–7069, Jul. 2011, doi: 10.1002/anie.201101351.
- [50] M. Ren *et al.*, 'Simultaneous Visualization of MiRNA-221 and Caspase-3 in Cancer Cells for Investigating the Feasibility of MiRNA-Targeted Therapy with a Dual-Color Fluorescent Nanosensor', *Biosensors (Basel)*, vol. 12, no. 7, Jul. 2022, doi: 10.3390/bios12070444.
- [51] C. J. Vickers, G. E. González-Páez, and D. W. Wolan, 'Selective detection of caspase-3 versus caspase-7 using activity-based probes with key unnatural amino acids', *ACS Chem Biol*, vol. 8, no. 7, pp. 1558–1566, Jul. 2013, doi: 10.1021/cb400209w.
- [52] M. Poręba, A. Strózyk, G. S. Salvesen, and M. Drąg, 'Caspase substrates and inhibitors', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 5, no. 8, Aug. 2013, doi: 10.1101/cshperspect.a008680.
- [53] M. Poreba, A. Szalek, P. Kasperkiewicz, W. Rut, G. S. Salvesen, and M. Drag, 'Small Molecule Active Site Directed Tools for Studying Human Caspases', *Chemical Reviews*, vol. 115, no. 22. American Chemical Society, pp. 12546–12629, Nov. 25, 2015. doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00434.
- [54] J. Xiao *et al.*, 'A coupled protein and probe engineering approach for selective inhibition and activity-based probe labeling of the caspases', *J Am Chem Soc*, vol. 135, no. 24, pp. 9130–9138, Jun. 2013, doi: 10.1021/ja403521u.