

# Biochemiczna charakterystyka pro-apoptotycznej proteazy HtraA3 człowieka

Przemysław Glaza

Białko HtrA3 należy do zachowanej w ewolucji rodziny proteaz serynowych HtrA (*high temperature requirement A*). U człowieka zidentyfikowano cztery białka HtrA: HtrA1, HtrA2/Omi, HtrA3 i HtrA4. Białko HtrA3 stymuluje szlak mitochondrialny apoptozy oraz uczestniczy w implantacji zarodka i formowaniu łożyska. Jest także zaangażowane w proces onkogenezy i promuje apoptozę komórek nowotworowych stymulowaną przez chemoterapeutyki. Z tego względu uważane jest za potencjalny cel terapii antynowotworowych. HtrA3 posiada trzy domeny: (1) N-terminalną domenę Mac25, która nie jest istotna dla aktywności proteolitycznej; (2) centralną domenę proteazową (PD); oraz (3) C-terminalną domenę PDZ. HtrA3 występuje w dwu izoformach, dłuższej, HtrA3L i skróconej, HtrA3S. HtrA3S nie posiada domeny PDZ, która jest zastąpiona przez unikalny rejon C-terminalny. Kiedy rozpoczynano tę pracę, wiedza na temat struktury i własności biochemicznych proteazy HtrA3 była ograniczona. Rozwiązana była jedynie struktura krystaliczna izolowanej domeny PDZ, brak było danych odnośnie aktywności opiekuńczej i istniało bardzo niewiele informacji dotyczących aktywności proteolitycznej. Celem tej pracy było poznanie struktury i scharakteryzowanie aktywności proteolitycznej oraz opiekuńczej białka HtrA3. Z uwagi na to, że w komórce domena N-terminalna jest odcinana, skoncentrowano się na białku HtrA3L pozbawionym tej domeny ( $\Delta$ N-HtrA3L).

Opracowano warunki produkcji rekombinowanego białka  $\Delta$ N-HtrA3L w komórkach bakteryjnych, w ilości oraz jakości pozwalającej na analizę krystalograficzną oraz badania biochemiczne. Do badań strukturalnych przygotowano preparaty nieaktywnego proteolitycznie białka  $\Delta$ N-HtrA3L S305A z uwagi na autoproteolityczną aktywność HtrA3. Badania krystalograficzne zostały wykonane przez współpracujący zespół w Structural Biology Center Argonne National Laboratory (USA). Rozwiązana została struktura domen PD i PDZ białka  $\Delta$ N-HtrA3L S305A. Białko to tworzy trimer, który różni się istotnie od proteaz HtrA1 i HtrA2 pod względem pozycji domeny PDZ wobec PD. Domena PDZ HtrA3 ułożona jest w pozycji pośredniej pomiędzy zajmowaną w „zamkniętej” formie HtrA2 a zajmowaną w „otwartej”, płaskiej formie HtrA1. Domena PDZ oddziałuje za pomocą wiązań wodorowych z resztami 196-201 pętli LB domeny proteazowej tego samego

monomeru. Oddziaływania te są cechą unikalną dla białka HtrA3L, nie występującą w dotychczas poznanych strukturach proteaz HtrA.

Aby określić rolę oddziaływań LB-PDZ skonstruowano warianty  $\Delta$ N-HtrA3L z substytucjami reszt w domenie PDZ i delecją unikalnych reszt LB. Sączenie molekularne (SEC) zmutowanych białek wskazało, że oddziaływania LB-PDZ stabilizują trimeryczną formę białka. SEC pokazało również, że białka pozbawione domeny PDZ ( $\Delta$ N-HtrA3 $\Delta$ PDZ i  $\Delta$ N-HtrA3S) są monomeryczne. Tak więc domena PDZ jest niezbędna do trimeryzacji, inaczej niż stwierdzono dla białek HtrA1 i HtrA2.

Stosując SEC oraz ultrawirowanie analityczne pokazano, że HtrA3 może tworzyć kompleksy z substratem, jednakże wyniki nie wskazywały na obecność oligomerów wyższego rzędu.

Usunięcie motywu trimeryzacji w PD spowodowało utratę aktywności proteolitycznej, co sugeruje, że zachowanie struktury trimerycznej jest istotne dla aktywności HtrA3 złożonego z domen PD i PDZ, podobnie jak stwierdzono dla HtrA1/2. Usunięcie domeny PDZ nie wpływało w sposób znaczący na aktywność proteolityczną, co świadczy o tym, że domena ta nie jest istotna dla proteolizy, podobnie jak opisano dla HtrA1 lecz odmiennie niż w HtrA2, gdzie PDZ hamuje aktywność.

Pokazano, że aktywność proteolityczna  $\Delta$ N-HtrA3 jest silnie stymulowana przez temperaturę, podobnie jak aktywność HtrA2. Proteaza  $\Delta$ N-HtrA3 hydrolizowała  $\beta$ -kazeinę porównywalnie do HtrA2 i znacząco szybciej od HtrA1. Wykazano, że białka  $\Delta$ N-HtrA3L/S bardzo efektywnie trawią antyapoptotyczne białko XIAP – istnieje więc możliwość, że HtrA3 stymuluje apoptozę poprzez proteolizę XIAP.

We współpracy z Zespołem prof. Adama Lesnera z W. Chemii UG, stosując spektrometrię mas, określono sekwencję peptydów powstających w wyniku proteolizy kilku substratów. Okazało się, że preferowane miejsca cięcia przez  $\Delta$ N-HtrA3L i  $\Delta$ N-HtrA3S są podobne – obie izoformy przecinały wiązania peptydowe za alifatycznymi i hydrofilowymi, pozbawionymi ładunku resztami aminokwasów. Specyficzność substratowa HtrA3 jest podobna do wykazanej dla HtrA1 i HtrA2.

Pokazano, że  $\Delta$ N-HtrA3L i  $\Delta$ N-HtrA3S przeciwdziałały agregacji termicznej modelowego białka, przy czym białko  $\Delta$ N-HtrA3L wykazywało wyższą aktywność opiekuńczą;  $\Delta$ N-HtrA3L nie było jednak zdolne do refaldowania zdenaturowanego białka. Wyniki te sugerują, że białko  $\Delta$ N-HtrA3 posiada aktywność opiekuńczą holdazy a nie – refoldazy, oraz że obecność domeny PDZ pozytywnie wpływa na aktywność holdazy.

Wyniki tej pracy pozwalają na lepsze zrozumienie funkcjonowania białka  $\Delta$ N-HtrA3 w warunkach *in vitro* i powinny ułatwić wyjaśnienie roli HtrA3 w stanach fizjologicznych oraz patologicznych. Uzyskane wyniki mogą zostać wykorzystane podczas projektowania nowych leków antynowotworowych.