

# Biochemiczna charakterystyka proapoptotycznych proteaz HtrA2 i HtrA3 człowieka

Tomasz Wenta

Białka HtrA2 oraz HtrA3 należą do rodziny zachowanych w procesie ewolucji proteaz serynowych HtrA (ang. *High temperature requirement A*), których cechą charakterystyczną jest obecność domeny proteazowej (PD) oraz co najmniej jednej domeny PDZ na końcu karboksylowym. U człowieka zidentyfikowano cztery białka HtrA (HtrA1-4), spośród których białko HtrA3 występuje w dwóch izoformach: długiej - HtrA3L i krótkiej - HtrA3S, która nie posiada domeny PDZ na C-końcu. Znaczenie współistnienia dwóch izoform białka HtrA3 nie zostało dotychczas wyjaśnione. Wykazano, iż proteazy HtrA2 i HtrA3 pełnią istotne funkcje w komórce. Uczestniczą one m.in. w utrzymywaniu homeostazy mitochondriów oraz indukowaniu mechanizmów śmierci komórki na drodze apoptozy, a zaburzenia w ich funkcjonowaniu przyczyniają się do rozwoju szeregu chorób, w tym nowotworowych. Części N-terminalne tych białek nie są istotne dla aktywności proteolitycznej i mogą być w komórce odcinane, generując formy  $\Delta$ N-HtrA2 oraz  $\Delta$ N-HtrA3.

Celem pierwszej części niniejszej pracy była weryfikacja hipotetycznego modelu aktywacji proteazy HtrA2, zakładającego, że w trakcie aktywacji zmienia się położenie domeny PDZ względem PD w trimerycznej cząsteczce białka. Skonstruowano zestaw wariantów białka  $\Delta$ N-HtrA2, w których wybrane reszty aminokwasowe położone na styku domen zostały wymienione na reszty o przeciwnych właściwościach chemicznych. Wpływ wprowadzonych substytucji na aktywność proteolityczną analizowano z wykorzystaniem  $\beta$ -kazeiny oraz syntetycznego peptydu fluorogenicznego. Stwierdzono, że aktywność wariantów  $\Delta$ N-HtrA2 V226K,  $\Delta$ N-HtrA2 D302A,  $\Delta$ N-HtrA2 R337L,  $\Delta$ N-HtrA2 I373N,  $\Delta$ N-HtrA2 E376L,  $\Delta$ N-HtrA2 L377E,  $\Delta$ N-HtrA2 R380L,  $\Delta$ N-HtrA2 E425L i  $\Delta$ N-HtrA2 R432L uległa podwyższeniu w większości badanych temperatur w stosunku do aktywności białka  $\Delta$ N-HtrA2. Wyniki te, w połączeniu z analizą kinetyki reakcji, sugerują, że destabilizacja oddziaływań między PD a PDZ w obrębie podjednostki oraz pomiędzy podjednostkami trimery promuje aktywację. Uzyskane wyniki są zgodne z teoretycznym modelem aktywacji proteazy HtrA2.

W kolejnym etapie pracy dokonano biochemicznej charakterystyki obu izoform białka HtrA3. Wykazano, że aktywność proteolityczna krótkiej izoformy,  $\Delta$ N-HtrA3S, jest porównywalna z aktywnością  $\Delta$ N-HtrA3L, co wskazuje, że domena PDZ nie jest konieczna dla aktywności białka  $\Delta$ N-HtrA3. Ponadto określono wpływ na aktywność proteolityczną

unikalnych dla tego białka oddziaływań reszt pętli LB domeny PD z resztami domeny PDZ (R362, E371, Q389). Pokazano, że unikalne reszty LB i ich interakcja z resztami PDZ promują aktywność proteolityczną  $\Delta$ N-HtrA3L wobec substratu peptydowego.

W ramach poszukiwania aktywatorów proteazy HtrA3 wykazano, że dwa nowe peptydy, oznaczone jako X1 oraz X2, opracowane oraz zsyntetyzowane w Zespole prof. A. Lesnera z Wydziału Chemii UG, efektywnie aktywowały proteazę  $\Delta$ N-HtrA3L. Istotny (50 %) wzrost aktywności  $\Delta$ N-HtrA3L obserwowano już przy 0,3  $\mu$ M stężeniu peptydu X1.

W kolejnym etapie pracy, za pomocą metody *pull down* oraz spektrometrii mas, wykorzystując lizat komórek nowotworowych płuc linii A549 dokonano identyfikacji potencjalnych substratów obu izoform  $\Delta$ N-HtrA3. Pokazano, że obie izoformy rekombinowanego białka (nieaktywne proteolitycznie) mogą oddziaływać z białkami formującymi cytoszkielet, białkami odpowiedzialnymi za utrzymywanie homeostazy komórkowej, ubiquitynację, procesy naprawy DNA, regulującymi śmierć komórkową, replikację DNA, modyfikację RNA oraz transport komórkowy, związany głównie z endocytozą. W dalszych badaniach skupiono się na potwierdzeniu formowania kompleksów HtrA3 z białkami cytoszkieletu, z białkiem opiekuńczym TCP1 niezbędnym dla formowania cytoszkieletu, oraz z anty-apoptocycznym białkiem XIAP. Za pomocą specyficznych przeciwciał sprawdzono, iż obie izoformy  $\Delta$ N-HtrA3 (nieaktywne proteolitycznie) tworzą kompleksy z aktyną,  $\beta$ -tubuliną, wimentyną, TCP1 oraz XIAP z lizatu komórkowego. Następnie, za pomocą immunoprecypitacji i metody *western blotting* potwierdzono, że białka te tworzyły kompleksy z endogennym HtrA3 komórek nowotworowych linii HCC827 oraz SKBR3 *in vivo*. Aby sprawdzić, czy obie izoformy HtrA3 oddziałują *in vivo* z badanymi białkami, wykonano ko-immunoprecypitację z egzogennie produkowanymi białkami  $\Delta$ N-HtrA3L oraz  $\Delta$ N-HtrA3S w formie nieaktywnej proteolitycznie, znakowanymi GFP. Analiza *western blotting* potwierdziła formowanie kompleksów *in vivo* z obiema izoformami HtrA3.

Za pomocą fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej pokazano kolokalizację endogennego HtrA3 komórek linii HCC827 i SKBR3 z aktyną,  $\beta$ -tubuliną, wimentyną, TCP1 oraz XIAP. Podobne doświadczenie wykonano również na komórkach A549 z egzogenną produkcją aktywnego proteolitycznie białka  $\Delta$ N-HtrA3S znakowanego GFP. Uzyskane wyniki potwierdziły kolokalizację krótkiej izoformy HtrA3 i badanych białek.

Aby stwierdzić, czy oddziaływania te nie zachodzą poprzez inne białka komórkowe, wykonano test immunoenzymatyczny ELISA. Uzyskane wyniki potwierdziły, że weryfikowane białka oddziałują z  $\Delta$ N-HtrA3 w sposób bezpośredni. W celu dokładnego oznaczenia efektywności wiązania  $\Delta$ N-HtrA3 do XIAP oraz TCP1 wykorzystano technikę

MST (ang. *MicroScale Thermophoresis*). Pokazano, iż  $\Delta$ N-HtrA3S nieznacznie efektywniej wiąże XIAP niż  $\Delta$ N-HtrA3L. W przypadku TCP1 odnotowano podobną efektywność wiązania przez obie izoformy  $\Delta$ N-HtrA3.

W celu weryfikacji charakteru oddziaływań badanych białek z HtrA3 przeprowadzono trawienie białek lizatu komórkowego linii A549, stosując rekombinowane białka HtrA3. Analizy *western blotting* ujawniły, że białka  $\Delta$ N-HtrA3L oraz  $\Delta$ N-HtrA3S trawią aktywną, wimentynę,  $\beta$ -tubulinę oraz XIAP. Nie zaobserwowano trawienia komórkowego białka TCP1.

Próbując wyjaśnić fizjologiczne znaczenie oddziaływania izoform  $\Delta$ N-HtrA3 z białkami cytoszkieletu, badano ich wpływ na proces polimeryzacji tubuliny. Pokazano, że zarówno nieaktywne jak i aktywne proteolitycznie białka  $\Delta$ N-HtrA3 znacząco wspomagały proces polimeryzacji tubuliny *in vitro*. Powyższe wyniki wskazują, iż aktywna, tubulina, wimentyna, TCP1 oraz XIAP są komórkowymi partnerami obu izoform HtrA3 oraz sugerują, że HtrA3 może uczestniczyć w modelowaniu szkieletu komórkowego.

Podsumowując, wyniki tej pracy pozwalają na lepsze zrozumienie funkcjonowania białka  $\Delta$ N-HtrA3 w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*, co może ułatwić wyjaśnienie roli tej proteazy w stanach fizjologicznych oraz patologicznych. Ponadto uzyskane wyniki mogą zostać wykorzystane podczas projektowania nowych leków antynowotworowych.