

I.1. Streszczenie

Proteaza HtrA2 człowieka należy do rodziny zachowanych w ewolucji białek HtrA (*high temperature requirement A*). Białka te są obecne u większości znanych organizmów zarówno prokariotycznych jak i eukariotycznych, w tym cztery zostały rozpoznane u ludzi. Białka z rodziny HtrA są endopeptydazami serynowymi degradującymi białka zdenaturowane lub natywne, często pełniące funkcje regulatorowe. W stanie fizjologicznym HtrA2 stanowi istotny element systemu kontroli jakości białek, niezbędny do utrzymania homeostazy mitochondriów, natomiast w warunkach stresu komórkowego odgrywa ważną rolę w mechanizmie indukcji apoptozy. HtrA2 zostało powiązane z procesem onkogenezy i chorobami neurodegeneracyjnymi (chorobą Parkinsona i Alzheimer), i postuluje się zastosowanie HtrA2 jako celu w terapii tych schorzeń. Proteazy HtrA wymagają aktywacji a struktura ich form aktywnych jest różna od struktury podstawowej, nieaktywnej. Do tej pory rozwiązano strukturę krystaliczną jedynie nieaktywnej formy HtrA2. Proteaza HtrA2 jest homotrimerem a jej podjednostki składają się z N-terminalnej domeny proteolitycznej (PD) oraz C-terminalnej domeny PDZ wiążącej peptyd substratowy lub regulatorowy. W formie spoczynkowej dostęp do centrum katalitycznego jest utrudniony z uwagi na interakcję PD z domeną PDZ. Aktywacja HtrA2 zachodzi pod wpływem wzrostu temperatury lub w efekcie związania peptydów do domeny PDZ. Molekularny mechanizm aktywacji HtrA2 nie jest w pełni poznany.

Celem tej pracy było wyjaśnienie zmian strukturalnych zachodzących w cząsteczce HtrA2 w trakcie aktywacji termicznej oraz w aktywacji przez związanie peptydu do domeny PDZ.

W niniejszej pracy potwierdzono, że aktywność HtrA2 jest stymulowana przez temperaturę, i że usunięcie domeny PDZ powoduje wzrost aktywności. Ponadto pokazano po raz pierwszy, że kinetyka proteolizy modelowego peptydu przez HtrA2 jest typowa dla enzymów allosterycznych. Potwierdzono aktywujący wpływ wcześniej opisanych peptydów i ponadto wykazano, że peptydy uprzednio znane jedynie jako wiążące się do izolowanej domeny PDZ, aktywują HtrA2. Wykazano aktywujący wpływ peptydów w temperaturach 25-45°C. Wyniki te świadczą o istotnym znaczeniu domeny PDZ w regulacji aktywności proteazy HtrA2.

Do monitorowania zmian strukturalnych zachodzących w trakcie aktywacji, skonstruowano zestaw wariantów białka HtrA2 z pojedynczymi substytucjami tryptofanowymi (Trp), zlokalizowanymi na styku PD oraz PDZ. Dostępność każdej z reszt do wodnego środowiska była określana poprzez pomiar wygaszania fluorescencji Trp w zależności od temperatury a wyniki te w połączeniu ze średnim czasem życia i maksimum fluorescencji Trp wskazywały

na relaksację struktury i wzrost ekspozycji powierzchni styku PD oraz PDZ. W obrębie obu domen zaobserwowano również znaczące zmiany strukturalne. Aby dokładniej scharakteryzować zmiany zachodzące w strukturze HtrA2, zastosowano metodę gaszenia fluorescencji przez tryptofan (*tryptophan-induced quenching* - TrIQ). Metoda TrIQ umożliwia monitorowanie zmian w strukturze białka dzięki właściwości reszt Trp, które są zdolne do wygaszania fluorescencji pochodnych bimanu. Intensywność wygaszania jest zależna od odległości między resztami Trp oraz fluoroforu, w zakresie 5 do 15 Å, co umożliwia monitorowanie niewielkich zmian wewnątrzcząsteczkowych. Wyniki TrIQ sugerują, że podczas aktywacji termicznej domena PDZ zmienia pozycję względem PD w obrębie podjednostki trimeru HtrA2 oraz zachodzi istotna zmiana strukturalna regulatorowej pętli L3 zlokalizowanej w PD. Ponadto, domena PDZ zmienia oddziaływanie z PD sąsiedniej podjednostki (PD*), w tym z regulatorową pętlą L1* zawierającą serynę centrum aktywnego. W zmianie układu oddziaływań w obrębie podjednostki oraz z podjednostką sąsiednią uczestniczy helisa $\alpha 5$ domeny PDZ, co sugeruje jej istotne znaczenie w aktywacji. Model zbudowany na podstawie wyników tej pracy przedstawia indukowany termicznie ruch domeny PDZ względem PD oraz PD*, który powoduje zwiększenie dostępu do bruzdy wiążącej peptyd domeny PDZ oraz do centrum aktywnego, a także opisuje zmiany konformacyjne regulatorowych pętli L3 oraz L1*. Metodę TrIQ wykorzystano także do monitorowania zmian strukturalnych zachodzących w cząsteczce HtrA3 pod wpływem peptydu aktywującego a uzyskane wyniki sugerują, że zmiany te są podobne, choć nie identyczne, do indukowanych termicznie.

W podsumowaniu, wyniki tej pracy w istotny sposób pogłębiły zrozumienie molekularnych zmian zachodzących w czasie aktywacji HtrA2 indukowanej termicznie lub przez związanie allosterycznego regulatora peptydowego do domeny PDZ.