

Streszczenie

Zastosowanie metod modelowania molekularnego do opisu mechanizmów kontroli aktywności metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej-9

Metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej-9 (MMP-9) jest jedną z najszerzej badanych metaloproteinaz, a przy tym jednym z najczęściej badanych białek enzymatycznych związanych z nowotworzeniem. Jako enzym modyfikujący strukturę macierzy zewnątrzkomórkowej w tkankach zwierzęcych jest bezpośrednio zaangażowana w liczne procesy fizjologiczne, ale także patologiczne. Dodatkowo właściwości regulatorowe MMP-9 w kontekście odpowiedzi immunologicznej, apoptozy czy angiogenezy sprawiają, że zrozumienie mechanizmów działania i kontroli jej aktywności są niezwykle istotne. Zapoznając się z literaturą łatwo można zauważyć, że badania biologiczne dotyczące MMP-9 skupiają się przede wszystkim na aspektach enzymatycznych oraz fizjologicznych. Aspekty strukturalne, zarówno samej MMP-9 jak i formowanych przez nią kompleksów, choć dobrze zarysowane, nie są jednak w satysfakcjonującym stopniu przebadane. Wynika to przede wszystkim z wysokiego stopnia złożoności układu. Za przykład może tu posłużyć fakt, że MMP-9 wydzielana jest przez komórki jako mieszanina monomerów i homomultimerów. Dodatkowo niektóre komórki, jak np. neutrofile, posiadają zdolność wydzielania MMP-9 w postaci stabilizowanego kowalencyjnie kompleksu z lipokaliną 2 (NGAL). Do każdej z tych form może dołączyć się podstawowy inhibitor MMP-9 – tkankowy inhibitor metaloproteinaz zewnątrzkomórkowych-1 (TIMP-1). Ze względu na znaczne różnice strukturalne MMP-9 względem pozostałych przedstawicieli MMPs, formowany przez nią kompleks z TIMP-1 charakteryzuje się dużą złożonością. Kompleks ten może występować nie tylko w formie inhibicyjnej, ale także nieinhibicyjnej. Te układy mogą sugerować odmienną drogę procesowania monomeru proMMP-9 i kompleksu proMMP-9-NGAL. Charakterystyka oddziaływań w tych kompleksach jest ważnym zagadnieniem dotyczącym wygaszania aktywności MMP-9. Do tego wszystkiego dochodzi jeszcze fakt, że pośród wszystkich MMPs ruchliwość i elastyczność domen MMP-9 jest największa, co znacznie utrudnia badania strukturalne. Opisana stosunkowo niedawno homotrimeryczna forma proMMP-9 posiada w literaturze zaledwie zarys struktury, oparty na wynikach obrazowania molekularnego, a dokładny układ jej podjednostek nie jest znany.

W rozprawie doktorskiej przedstawione zostały wyniki modelowania molekularnego struktur MMP-9 i jej kompleksów, które tworzą się na drodze kontroli jej aktywności enzymatycznej. Do opracowania modeli takich układów zostały wykorzystane dostępne w Protein Data Bank struktury MMP-9, TIMP-1 oraz NGAL lub ich fragmenty. Wykorzystane metody obejmują klasyczną mechanikę i dynamikę molekularną, zarówno pełnoatomową, jak i gruboziarnistą, dokowanie białko-białko, a także najnowsze metody uczenia maszynowego, jak np. wzbudzający duże zainteresowanie AlphaFold 2.

Pierwszą spośród opracowanych struktur stanowi pełny model inhibicyjny kompleksu MMP-9-TIMP-1. Model ten wyjaśnia na poziomie atomowym oddziaływanie MMP-9 z jej najważniejszym inhibitorem tkankowym. Wykonane badania stanowią pierwszy opis pełnego, tak złożonego układu inhibicyjnego w całej rodzinie białek MMPs. Wyniki wskazują nie tylko na zaangażowanie domeny fibronektynowej MMP-9 w oddziaływanie z TIMP-1, ale także na wzajemne oddziaływanie domeny fibronektynowej i hemopeksynowej MMP-9 w inaktywowanej przez TIMP-1 strukturze.

Drugim opracowanym modelem jest homotrimer proMMP-9. Stanowi on cenny wkład w zrozumienie mechaniki funkcjonowania tej formy MMP-9, zarówno w aspekcie oddziaływania z inhibitorem TIMP-1, jak i jej aktywacji proteolitycznej. Szczególnie ciekawym aspektem wydaje się kooperacja podjednostek MMP-9 w wiązaniu włókna kolagenowego.

Trzeci model reprezentuje strukturę kompleksu MMP-9-NGAL. Charakterystyka kompleksów zawierających układ MMP-9-NGAL stanowi pierwszy tak dokładny opis strukturalny tej formy MMP-9. Z uwagi na to, że funkcja układów MMP-9-NGAL nie została jeszcze zidentyfikowana, opisane wyniki mogą umożliwić dokładniejszą analizę badań eksperymentalnych i przybliżyć zrozumienie funkcjonalnego znaczenia kompleksowania MMP-9 przez NGAL.

Wszystkie wyznaczone metodami modelowania molekularnego struktury, bezpośrednio lub pośrednio, wywierają wpływ na aktywność enzymatyczną MMP-9. Badania teoretyczne i obliczeniowe tych układów pozwoliły na przeanalizowanie i zrozumienie pewnych mechanizmów, wyróżniających MMP-9 na tle pozostałych MMPs oraz umożliwiły rozszerzenie dostępnej wiedzy na temat struktury MMP-9 oraz formowanych przez nią kompleksów, które mogą regulować jej aktywność enzymatyczną. Poznanie molekularnych podstaw tych regulacji może przyczynić się do zrozumienia mechanizmów prowadzących do rozwoju i eskalacji schorzeń charakteryzujących się podwyższoną aktywnością MMP-9, a także do opracowania nowych strategii terapeutycznych.