

Warszawa 03.10.2023

Dr hab. Bartosz Różycki
Instytut Fizyki PAN
Aleja Lotników 32/46
02-668 Warszawa
tel.: 22 116 3224
e-mail: rozycki@ifpan.edu.pl

Opinia o rozprawie doktorskiej pana magistra Łukasza Charzewskiego zatytułowanej
“Zastosowanie metod modelowania molekularnego do opisu mechanizmów kontroli aktywności
metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej-9”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pana magistra Łukasza Charzewskiego poświęcona jest opracowaniu modeli strukturalnych kilku kompleksów białkowych zawierających metaloproteinę macierzy zewnątrzkomórkowej 9 (MMP-9). Rozprawa składa się z 9 rozdziałów, wykazu literatury, 10 protokołów i 22 załączników. Rozdział 1 definiuje cel pracy. Rozdział 2 jest podsumowaniem istotnych w kontekście rozprawy informacji na temat metaloprotein macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP). Rozdziały 3, 4 i 5 dotyczą odpowiednio aktywacji, aktywności enzymatycznej i wygaszania aktywności metaloproteiny MMP-9. Rozdziały te są napisane bardzo starannie, zawierają przegląd istotnych dla rozprawy pojęć i jednocześnie demonstrują znajomość literatury specjalistycznej na temat MMP-9. Rozdział 6 stanowi skrótowy opis metod, które zostały użyte do modelowania struktur kompleksów MMP-9. Rozdział 7 zawiera główne wyniki pracy doktorskiej. Składa się on z 6 podrozdziałów, które dotyczą modelowania inaktywnego monomeru MMP-9 (podrozdział 7.1), homotrimeru proMMP-9 (podrozdział 7.2), domeny OG w homotrimerze proMMP-9 (podrozdział 7.3), nieinhibycyjnego kompleksu homotrimeru proMMP-9 z TIMP-1 (podrozdział 7.4), aktywowanego homotrimeru MMP-9 (podrozdział 7.5) i kompleksu MMP-9 z NGAL (podrozdział 7.6). Rozdział 7 uzupełnia 10 protokołów i 22 załączników, które zamieszczone są na końcu rozprawy. Rozdział 8 opisuje próbę zastosowania algorytmu AlphaFold 2 do modelowania struktur kompleksów białkowych przedstawionych w rozdziale 7. Rozdział 9 stanowi zwięzłe podsumowanie rozprawy.

W podrozdziale 7.1 przedstawione zostało opracowanie modelu strukturalnego metaloproteiny MMP-9 związanej z inhibitorem TIMP-1. Opracowany model został szczegółowo przeanalizowany. Za pomocą metody MM-GBSA wyznaczone zostały energie oddziaływania pomiędzy podjednostkami tego kompleksu białkowego. Ponadto szczegółowo opisane zostały kontakty pomiędzy MMP-9 a TIMP-1.

Podrozdział 7.2 dotyczy modelowania homotrimeru proMMP-9 bez nieustrukturyzowanych łączników pomiędzy domenami katalitycznymi a domenami hemopeksynowymi. Wykorzystane zostały tu dwie metody — symulacje dynamiki molekularnej w ramach gruboziarnistego modelu MARTINI oraz dokowanie białko-białko przy użyciu serwera GRAMM-X. Pierwsza metoda nie dostarczyła satysfakcjonujących wyników. Modele strukturalne otrzymane z symulacji MARTINI były niezgodne z wynikami obrazowania homotrimeru proMMP-9 metodą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM). Natomiast dokowanie metodą GRAMM-X umożliwiło opracowanie modelu strukturalnego, który wydaje się być zgodny z wynikami obrazowania metodą

TEM oraz z innymi obserwacjami doświadczalnym. Model ten został szczegółowo przeanalizowany. Wyznaczone zostały oddziaływania stabilizujące kolistą strukturę homotrimeru proMMP-9. Zbadana została możliwość przyłączenia łańcuchów cukrowych w N-glikozylowanych miejscach propeptydu i domeny katalitycznej w każdej z podjednostek. Sprawdzona została także możliwość związania inhibitora TIMP-1 do domeny hemopeksynowej oraz dostępność regionów MMP-9 wymaganych do aktywacji proteolitycznej tej metaloproteiny.

W podrozdziale 7.3 przedstawione zostały metody i wyniki modelowania domen OG (tzn. nieustrukturyzowanych łączników pomiędzy domenami katalitycznymi a domenami hemopeksynowymi) w homotrimerze proMMP-9. Wykorzystany został tu model strukturalny przedstawiony w podrozdziale 7.2. Przyjęto założenie, że każda z domen OG związana jest kowalencyjnie poprzez mostek dwusiarczkowy i wiązanie peptydowe na C-końcu z dwiema różnymi domenami hemopeksynowymi w homotrimerze proMMP-9. Przy tym założeniu rozważonych zostało sześć możliwości poprowadzenia nieustrukturyzowanych domen OG w homotrimerze proMMP-9. Analiza geometryczna i energetyczna opracowanych modeli strukturalnych doprowadziła do wskazania najbardziej prawdopodobnej konfiguracji domen OG w homotrimerze proMMP-9. Zaproponowano, że do tego samego łańcucha polipeptydowego należą domeny katalityczna i hemopeksynowa położone na przeciwległych stronach okręgu, a domena OG tworzy mostek dwusiarczkowy z tą domeną hemopeksynową, która kontaktuje się z domeną fibronektynową danego łańcucha polipeptydowego.

W podrozdziale 7.4 przedstawione zostało opracowanie strukturalnego modelu heteroheksameru proMMP-9—TIMP-1, tzn. nieinhibycyjnego kompleksu homotrimeru proMMP-9 z TIMP-1. Wykorzystano tu modele strukturalne przedstawione w poprzednich podrozdziałach. Obliczenia metodą MM-GBSA wykazały, że energia oddziaływania TIMP-1 z proMMP-9 w układzie homotrimerycznym ma wartość pomiędzy wartościami energii w układach monomerycznych — nieinhibycyjnym i pełnym inhibycyjnym — co oznacza, że energetycznie najkorzystniejsze oddziaływanie TIMP-1 z MMP-9 występuje w układzie, w którym TIMP-1 blokuje aktywność MMP-9.

W podrozdziale 7.5 przedstawiony został model strukturalny aktywowanej formy homotrimerycznej MMP-9. Model ten został otrzymany przez usunięcie propeptydu ze struktury homotrimeru proMMP-9 opracowanej w podrozdziałach 7.2 i 7.3. Przedstawione zostały wyniki symulacji dynamiki molekularnej, które sugerują, że usunięcie propeptydu powoduje znaczne zwiększenie swobody konformacyjnej homotrimeru MMP-9. Uzyskany model strukturalny został użyty do przeprowadzenia analizy możliwości związania przez homotrimer MMP-9 potrójnej helisy kolagenu. Model aktywowanego homotrimeru MMP-9 został także użyty do próby odpowiedzi na pytanie, dlaczego biwalenty inhibitor MMP-9 wykazuje większą aktywność względem formy trimerycznej niż monomerycznej.

Podrozdział 7.6 dotyczy modelowania MMP-9 związanej z lipokaliną-2 (NGAL). Przedstawione zostało opracowane modeli strukturalnych domeny hemopeksynowej MMP-9 związanej z NGAL kowalencyjnie (poprzez mostek dwusiarczkowy) i niekowalencyjnie (pod nieobecność mostka dwusiarczkowego). Modele te umożliwiły zidentyfikowanie regionu domeny hemopeksynowej, który NGAL chroni przed cięciem proteolitycznym i degradacją. Przedstawiona została także konstrukcja modelu strukturalnego MMP-9 związanej zarówno z NGAL jak i z TIMP-

1. Model ten sugeruje, że NGAL nie tylko nie zaburza mechanizmu blokowania aktywności MMP-9 przez TIMP-1, ale wręcz stabilizuje cząsteczkę TIMP-1 tworząc z nią dodatkowe kontakty.

Rozdział 8 przedstawia próbę zastosowania algorytmu AlphaFold 2 do określenia struktur kompleksów białkowych omówionych w rozdziale 7. Przewidywania otrzymane na podstawie algorytmu AlphaFold 2 zostały porównane z wynikami modelowania układów MMP-9 opisanymi w rozdziale 7 oraz zestawione z wiedzą na temat biologicznych funkcji i działania tych układów. Okazuje się, że jedynie struktury tych układów, których homologi znajdują się w bazie PDB, zostały przewidziane przez AlphaFold 2 poprawnie. Przewidywania AlphaFold 2 dotyczące pozostałych struktur (w tym struktury homotrimeru proMMP-9) okazały się nieprzydatne w badaniach nad MMP-9. Wniosek płynący z rozdziału 8 jest taki, że klasyczne metody modelowania molekularnego pozostają lepszym narzędziem do badania kompleksów białkowych zawierających MMP-9. Uważam, że wniosek ten jest wartościowy i pouczający.

Rozprawa napisana jest starannie i z dużą dbałością o szczegóły. Drobne zastrzeżenia mogą budzić tylko pewne skróty myślowe. Przykładowo, w rozdziale 7 kilkakrotnie powtarza się nieprecyzyjne stwierdzenie "symulacje ustabilizowały się po czasie...". Zdanie "automatycznie wygenerowana topologia homotrimeru w układzie została zmieniona na topologię wygenerowaną oddzielnie..." w protokole 7 na stronie 182 jest niejasne.

Za słabszy punkt rozprawy można uznać brak uzasadnienia wyboru metod i parametrów modelowania molekularnego. Nie został w szczególności uzasadniony wybór pola siłowego CHARMM27 do symulacji dynamiki molekularnej kompleksów MMP-9. Brak jest także wyjaśnienia, dlaczego do modelowania gruboziarnistego zastosowany został model MARTINI.

Praca doktorska wydaje się być merytorycznie poprawna. Przedstawione wyniki są oryginalne i wartościowe, a pewien niedosyt budzą tylko dwa punkty pracy. Po pierwsze, trudno oprzeć się podejrzeniu, że skłębiona i zwarta konformacja domeny OG, która opisana została w podrozdziale 7.1, może być artefaktem pola siłowego CHARMM27. Warto by było sprawdzić, jakie konformacje przybiera domena OG w symulacjach dynamiki molekularnej z nowszym, poprawionym polem siłowym CHARMM36m, które wydaje się bardziej odpowiednie do modelowania i symulacji białek nieustrukturyzowanych częściowo lub całkowicie. Po drugie, niesatysfakcjonujące wyniki symulacji homotrimeru proMMP-9 w ramach gruboziarnistego modelu MARTINI, które przedstawione zostały w podrozdziale 7.2.1, nie są zaskakujące, gdyż model MARTINI 2.2 bez poprawek oddziaływania białko-woda nie wydaje się być optymalnym narzędziem do symulacji dokowania białko-białko. Szkoda, że w tej części pracy doktorskiej nie została podjęta próba użycia innego modelu gruboziarnistego (np. UNRES lub CABS lub SIRAH).

Pomimo opisanych powyżej drobnych uwag, uważam rozprawę pana magistra Łukasza Charzewskiego za wartościową pracę badawczą spełniającą ustawowe i zwyczajowe warunki stawiane pracom doktorskim. Autor wykazał w niej bardzo dobrą znajomość literatury naukowej na temat metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej, zastosował z powodzeniem metody modelowania molekularnego i uzyskał szereg oryginalnych przewidywań, które mogą przyczynić się do lepszego poznania mechanizmów kontroli aktywności MMP-9. Większa część wyników przedstawionych w rozprawie została opublikowana w czasopiśmie naukowym *Scientific Reports*. Z całym przekonaniem stawiam wniosek o dopuszczenie pana magistra Łukasza Charzewskiego do publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

Bartosz Rojczyk