

Received: 2008.03.13
Accepted: 2008.06.03
Published: 2008.07.03

Metaloproteiny MMP. Struktura i funkcja*

Metalloproteinases. Structure and function

Dominik Lipka¹, Janusz Boratyński^{1,2}

¹ Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk im. Ludwika Hirszfelda, Wrocław

² Akademia im. Jana Długosza w Częstochowie, Instytut Chemii i Ochrony Środowiska, Zakład Mikrobiologii i Biotechnologii, Częstochowa

Streszczenie

Metaloproteiny macierzowe (MMP – **m**atrix **m**etallo**p**roteinases) wchodzą w skład licznej rodziny wielodomennych cynkowych endopeptydaz. Należą one do głównych enzymów proteolitycznych trawiących komponenty macierzy pozakomórkowej oraz liczne molekuly na powierzchni komórek, uczestnicząc przez to w wielu procesach fizjologicznych, takich jak apoptoza czy angiogeneza. Metaloproteiny są również zaangażowane w patogenезę wielu chorób, takich jak np. artretyzm czy nowotwory. Opracowanie skutecznych inhibitorów oraz poznanie mechanizmów ich działania może mieć istotny wpływ na strategie terapeutyczne.

Słowa kluczowe:

metaloproteiny • enzymy proteolityczne • MMP • macierz pozakomórkowa • nowotwory • choroby autoimmunologiczne • kolagenazy • migracja komórek

Summary

Matrix metalloproteinases (MMPs) belong to a large family of multidomain zinc endopeptidases. They are one of the most important proteolytic enzymes which digest components of the extracellular matrix and abundant macromolecules on cell surface and take part in many physiological processes, such as apoptosis or angiogenesis. MMPs are also engaged in the pathogenesis of many diseases such as arthritis and cancer. The development of effective inhibitors and discovery of their mechanisms of action can have significant influence on therapeutic strategy.

Key words:

metalloproteinases • proteolytic enzymes • MMP • extracellular matrix • cancer • autoimmune diseases • collagenases • cell migration

Full-text PDF:

<http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=863808>

Word count:

3426

Tables:

1

Figures:

6

References:

29

Adres autora:

dr hab. Janusz Boratyński, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda, ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: borat@iitd.pan.wroc.pl

* Publikacja finansowana w ramach działalności statutowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN (zadanie nr 5).



Wykaz skrótów: **MMP** – macierzowe metaloproteinazy (matrix metalloproteinases); **TIMP** – tkankowy inhibitor metaloproteinaz (tissiu inhibitor of metalloproteinases); **GPI** – glikofosfatydyloinozytol (glycosylphosphatidyloinositol); **IGF** – insulinopodobny czynnik wzrostu (insulin-like growth factor); **PDEF** – czynnik pochodzący z nabłonka barwnikowego siatkówki (pigment epithelium-derived factor); **ECM** – macierz pozakomórkowa (extra cellular matrix).

WSTĘP

Macierzowe metaloproteinazy należą do super rodziny wielodomenowych enzymów proteolitycznych zawierających w charakterystycznym dla nich centrum katalitycznym jon cynku. Są one wydzielane w postaci proenzymu poza komórkę lub pozostają związane z błonami komórkowymi. Pierwszą poznaną metaloproteinazą była odkryta w ogonie kijanki kolagenaza 1 (MMP-1). O przynależności do grupy metaloproteinaz MMP decyduje homologia konserwatywnych sekwencji obecnych w MMP-1, takich jak cysteinowy przełącznik PRCGXPD w propeptydzie zymogenu (proMMP) oraz sekwencji HEXGHXXGXXH wiążącej cynk w miejscu katalitycznym [16]. Drugą grupą enzymów należącą do super rodziny macierzowych metaloproteinaz są blisko spokrewnione z MMP enzymy ADAM (**A** disintegrin **and** **m**etalloproteinases), które różnią się od MMP budową czwartorzędową. Zawierają one dodatkowe domeny i mają konserwatywne motywy charakterystyczne dla propeptydu oraz domeny katalitycznej MMP-1 [9].

METALOPROTEINAZY (MMP)

Według obecnego stanu wiedzy rodzina macierzowych metaloproteinaz MMP to 21 enzymów podzielonych na podgrupy różniące się nieznacznie strukturą czwartorzędową oraz swoistością substratową. Jednak podział ten jest dokonywany na podstawie nieostrych kryteriów, co jest przyczyną pewnych dowolności w nazewnictwie tej grupy enzymów. Listę MMP przedstawiono w tabeli 1.

W piśmiennictwie spotyka się różne nazwy metaloproteinaz. Istnieje podział MMP na podgrupy zgodnie z kryterium ich budowy oraz swoistością. Wszystkie MMP zawierają: propeptyd i wchodzący w jego strukturę peptyd sygnałowy kierujący je do miejsc docelowych i domenę katalityczną.

Matrylizyny

Matrylizyny są najmniejszymi członkami MMP. Charakteryzują się brakiem domeny hemopeksyny [27]. Nazywane są także endometaloproteinazami (MMP-1, MMP-7). Poza makrocząsteczkami macierzy pozakomórkowej (ECM) ich substratami są cząsteczki obecne na powierzchni komórki Fas-ligand, pro-TNF czy E-kadheryna, przez co uczestniczą m.in. w takich procesach fizjologicznych, jak np. apoptoza komórki [29].

Kolagenazy

Do tej grupy należą MMP-1,-8,-13. W odróżnieniu od matrylizyn zawierają one domenę hemopeksyny oraz giętki łącznik spajający ją z domeną katalityczną. Substratami tej grupy enzymów są kolageny typu I, II, III, V oraz IX. Cechą charakterystyczną tych enzymów jest zdolność do hydrolizowania superhelisy kolagenowej w około $\frac{3}{4}$ długości łańcucha między Gly⁷⁷⁵ – Ile⁷⁷⁶ α 1 łańcucha i Gly⁷⁷⁵ – Leu⁷⁷⁶ 2 [3]. Prawdopodobnie zdolność tę zawdzięczają domenie hemopeksyny.

Stromelizyny

Dwa enzymy należące do tej grupy (MMP-3, MMP-10) wykazują tę samą swoistość substratową, przy czym MMP-3 charakteryzuje większa efektywność proteolityczna [29]. Oprócz hydrolizy komponentów ECM, MMP-3 aktywuje liczne zymogeny MMP (proMMP), jej obecność jest konieczna do aktywacji MMP-1 [25]. MMP-11 (inna nazwa to stromelizyna), jednak ze względu na różnice w swoistości substratowej zaliczana jest ona grupy „pozostałych MMP” [29].

Gelatynyzy

Należące do tej grupy enzymy (MMP-2 oraz MMP-9) charakteryzują się występowaniem w domenie katalitycznej motywu złożonego z trzech modułów typu II fibronektynowego oraz dużej swoistości substratowej względem zdenaturowanego kolagenu i żelatyny [4]. Swoistość substratową zawdzięczają one insertowi fibronektyny, który wiąże się do żelatyny oraz lamininy [4]. Ponadto, MMP-2 hydrolizuje wiązania peptydowe w I, II oraz III typie kolagenu [2]. Wykazano, że brak aktywnej MMP-2 u myszy prowadzi do zaburzeń rozwoju kości w związku z czym zasugerowano, że jest ona istotnym czynnikiem biorącym udział w procesie osteogenezy [12].

Błonowe MMP

Do błonowych MMP należy sześć enzymów podzielonych na dwie grupy. Do grupy pierwszej należą makrocząsteczki należące do typu I białek błonowych. Są to MMP-14,-15,-16 i -24. Do grupy drugiej (MMP-17 i -25) należą białka połączone z GPI (glikofosfatydyloinozytolem). Wszystkie, z wyjątkiem MMP-17, biorą udział w aktywacji proMMP-2 [29]. Substratami tych enzymów są także liczne komponenty ECM. Wykazano, że MMP-14 jest istotnie zaangażowana w procesie angiogenezy [21].

Sequência	Resíduo
YRPGDRHNSFDDGPGNLAHAFGGCGGLAHEDDERMNNFRREYMLRVAHELGHSLGLSHLGLGALVYHSRHSQ	MMP1
FYORDHGDNSFDDGPGNLAHAFGGCGGLAHEDDERMNNFRREYMLRVAHELGHSLGLSHLGLGALVYHSRHSQ	MMP8
YRPGDRHNSFDDGPGNLAHAFGGCGGLAHEDDERMNNFRREYMLRVAHELGHSLGLSHLGLGALVYHSRHSQ	MMP2
YRPGDRHNSFDDGPGNLAHAFGGCGGLAHEDDERMNNFRREYMLRVAHELGHSLGLSHLGLGALVYHSRHSQ	MMP13
YRPGDRHNSFDDGPGNLAHAFGGCGGLAHEDDERMNNFRREYMLRVAHELGHSLGLSHLGLGALVYHSRHSQ	MMP10
YRPGDRHNSFDDGPGNLAHAFGGCGGLAHEDDERMNNFRREYMLRVAHELGHSLGLSHLGLGALVYHSRHSQ	MMP7
YRPGDRHNSFDDGPGNLAHAFGGCGGLAHEDDERMNNFRREYMLRVAHELGHSLGLSHLGLGALVYHSRHSQ	MMP12
YRPGDRHNSFDDGPGNLAHAFGGCGGLAHEDDERMNNFRREYMLRVAHELGHSLGLSHLGLGALVYHSRHSQ	MMP11
YRPGDRHNSFDDGPGNLAHAFGGCGGLAHEDDERMNNFRREYMLRVAHELGHSLGLSHLGLGALVYHSRHSQ	MMP16

Ryc. 1. Zestawienie sekwencji aminokwasów w konserwatywnych motywach domen katalitycznych MMP; korzystano z programu Clustal X. Sekwencje pobrano z bazy danych SwissPDB

Tabela 1. Wykaz MMP

MMP	E.C.No	Nazwa potoczna	Substrat
MMP-1	3.4.21.32	kolagenaza	kolagen typ I, II, III, V, VII, VIII i X
MMP-2	3.4.24.B7	gelatynaza	kolagen typ I, IV, V, VII, X oraz żelatynę i elastynę
MMP-3	3.4.24.17	stromelizyna 1, proteoglikanaza	elastyna, proglukany, agrekany, żelatyna, proMMP-1,-8,-9
MMP-7	3.4.24.23	matrylizyna, metaloendopeptydaza	kolagen typ IV, glikoproteiny, żelatyna
MMP-8	3.4.24.34	kolagenaza 2	kolagen typ I, II, III i IV
MMP-9	3.4.24.35	gelatynaza B	kolagen typ IV żelatyna, laminan
MMP-10	3.4.24.22	stromelizyna 2	kolagen typ I, II, III, V
MMP-11	3.4.24.B3	stromelizyna 3	laminan, inhibitor 1 proteinazy, antytrypsyna
MMP12	3.4.24.65	elastaza, MME	elastyna
MMP13	3.4.24.B4	kolagenaza 3	kolagen typ I, II, III, IV, V, IX, X i XI, żelatyna, laminan
MMP-14	3.4.24.80	MT1-MMP	kolagen typ I, II, III, żelatyna, laminan agrekany, proMMP-2,-13
MMP-15	3.4.24.B5	MT2-MMP	kolagen typ I, II, III, żelatyna, proMMP-13
MMP-16	brak	MT3-MMP	kolagen typ I, II, laminan, proMMP-2,-13
MMP-17	brak	MT4-MMP	fibronektyna, fibryna, żelatyna
MMP-18	brak	kolagenaza 4, <i>Xenopus</i>	
MMP-19	brak	RASI 1	
MMP-20	3.4.24.B6	enamelizyna	amelagenina, agrekany
MMP-23	brak	CA-MMP	
MMP-24	brak	MT5-MMP	proMMP-2,-13
MMP-25	brak	MT6-MMP	proMMP-2
MMP-26	3.4.24.B7	matrylizyna, endometaza	

„Pozostałe MMP”

Siedem z 21 enzymów należących do rodziny MMP nie zostało przypisanych do żadnej z powyższych grup: metaloelastaza jest głównie ekspresjonowana w makrofagach i odpowiada za zdolność do migracji [24]. MMP-19, odkryty w naczyniach krwionośnych błony maziowej pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów [13]. Enamelizyna (MMP-20) hydrolizująca amelogeninę jest umiejscowiona głównie na nowo powstałym szkliwie, a brak tego enzymu wywołuje problemy związane z jego prawidłowym rozwojem [14]. MMP-23 występuje głównie w tkankach rozrodczych. Charakteryzuje się brakiem przełącznika cysteinowego w prodomecie i brakiem domeny hemopeksyny oraz występowaniem bogatej w cysteinę domeny położonej tuż za motywem immunoglobulinopodobnym [28]. Epilizyna MMP-28 występuje głównie w keratynocytach. Sugeruje się, iż bierze ona udział w procesie hemostazy oraz gojeniu ran [15].

STRUKTURA MMP

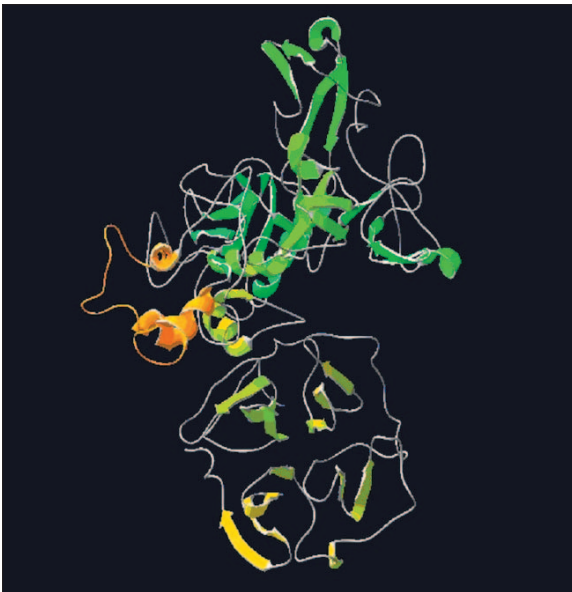
Krystalografia rentgenowska oraz jądrowy rezonans magnetyczny (NMR), pozwalają ustalić trzecio- i czwartorzędową strukturę licznych metaloproteinaz MMP.

MMP są enzymami wielodomenowymi, zbudowanymi co najmniej z domeny katalitycznej i prodomey (wyjątkiem jest MMP-23). Poza tymi dwoma domenami najczęściej występującymi elementami budowy MMP jest domena hemopeksyny oraz elastyczny łącznik łączący ją z domeną katalityczną.

Domena katalityczna

Domena katalityczna jest odpowiedzialna za aktywność proteolityczną enzymu, jest zbudowana z pięciu β wstążek (dla ułatwienia ponumerowanych od I do V, zaczynając od leżącej najbliższej N-końca), trzech α helis (oznaczonych od A do C, zaczynając od leżącej najbliższej N-końca) oraz łączących je pętli. W domenie znajduje się jeden katalityczny i jeden strukturalny jon cynku i przeważnie trzy jony wapniowe. Miejsce aktywne znajduje się na powierzchni enzymu w bruzdzie dzielącej domenę na dwie podjednostki „dolną” – mniejszą oraz „górną” – większą. Podjednostka górna zawiera pięć „wysoko poskręcanych” β wstążek okrążonych przez trzy znajdujące się na powierzchni pętli oraz dwie z trzech α helis (A i B). Wszystkie poza jedną (β wstążką oznaczoną numerem IV) są skierowane w tym samym kierunku. Miejsce wiązania substratu jest utworzone przez wstążkę IV, helisę B oraz pętlę rozciągającą się za helisą B. W miejscu aktywnym jon cynku koordynowany





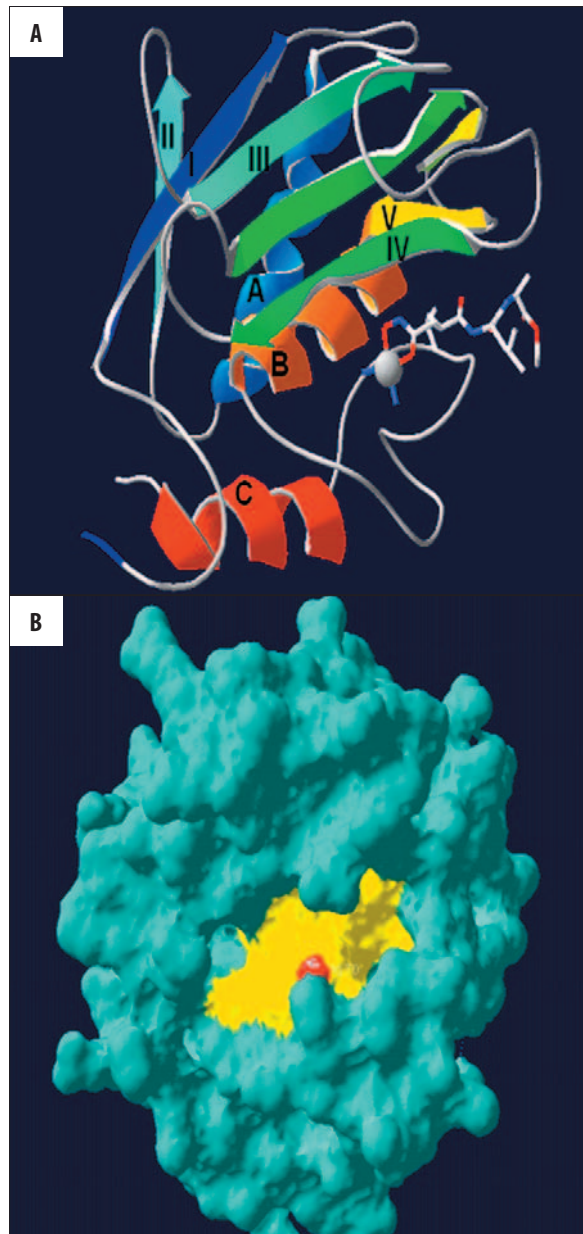
Ryc. 2. Prometaloproteinaza 2; kolorem pomarańczowym zaznaczono prodomenę, zielonym domenę katalityczną, a żółtym domenę hemopeksyny. Ilustrację wykonano za pomocą programu Swiss PDB. Współrzędne struktury pobrano z bazy danych PDB.org

jest przez trzy histydyny. Za odpowiednią strukturę wokół jonu cynku katalitycznego odpowiada motyw „Met-turn”. Czwartym ligandem katalitycznego cynku jest cząsteczka wody. W przestrzeni w jakiej domena katalityczna została przedstawiona na ryc. 3 substrat wiąże się z lewej do prawej strony zaczynając od N-końca do C-końca w taki sposób, że grupa karbonylowa substratu będąca nową grupą tworzącą C-koniec oddziałuje z cynkiem katalitycznym zastępując cząsteczkę wody [16].

Swoistość substratowa metaloproteinaz w dużej mierze jest determinowana przez miejsce aktywne enzymu. Szczególnie istotna jest tutaj kieszeń swoistości zwana kieszenią S1', która znajduje się „na prawo” od cynku katalitycznego. Oddziałuje ona z łańcuchami bocznymi aminokwasów, które po hydrolyzie wiązania znajdują się na N końcu trawionego fragmentu białka [5]. Mechanizm reakcji katalitycznej jest podobny do innych enzymów zawierających jon cynku w miejscu aktywnym, takim jak np. karboksypeptydaza A. Mechanizm reakcji przebiega poprzez aktywację cząsteczki wody będącej czwartym ligandem cynku. Dzięki bliskości reszty kwasu glutaminowego w miejscu katalitycznym, cząsteczka wody nabiera cech grupy hydroksylowej OH⁻. Drugim etapem reakcji jest nukleofilowy atak zaktywowanej cząsteczki wody na węgiel karbonylowy rozszczepianego wiązania peptydowego, z jednoczesnym przeniesieniem protonu z zaktywowanej cząsteczki wody na kwas glutaminowy. W jego wyniku powstaje ujemnie naładowany tetraedryczny produkt przejściowy. W następnym etapie następuje przeniesienie protonu z grupy -COOH kwasu glutaminowego na grupę NH wiązania peptydowego, co powoduje zerwanie wiązania peptydowego i opuszczenie miejsca aktywnego przez substrat.

Prodomena

Prodomena zawiera propeptyd utrzymujący enzym w postaci nieaktywnej (zymogen proenzym, pro MMP). Jak



Ryc. 3. Katalityczna domena metaloproteinazy 1, MMP-1. **A** – domena katalityczna w sposób uwidaczniający położenie względem siebie poszczególnych α helis oraz β wstążek. N – koniec zaznaczony kolorem niebieskim, uwidoczniono też położenie cynku katalitycznego. **B** – powierzchnia MMP -1, kolorem żółtym oznaczono miejsce aktywne, a kolorem czerwonym cynk katalityczny. Korzystano z programu Swiss PDB. Współrzędne struktury pobrano z bazy danych PDB.org

dotąd opisano struktury prodomen MMP-1, -2, -3 oraz -9. Domena jest zbudowana z trzech α helis połączonych elastycznymi pętlami narażonymi na autoprotolizę. W przypadku MMP-1 oraz MMP-2 rejon hydrolyzy znajduje się między pierwszą i drugą helisą. Za trzecią helisą znajduje się konserwatywny motyw związany z przełącznikiem cysteinowym, który tworzy czwarty ligand w zymogenie (jest to przyczyna braku aktywności białka). Prodomena zakrywając miejsce wiązania substratu S3' do S2 tworzy pięć wiązań wodorowych. Jej położenie jest odwrot-



Ryc. 4. Prodomena (kolor ciemnoniebieski) z domeną katalityczną MMP – 2; zaznaczono także Cys 92. Korzystano z programu Swiss PDB. Współrzędne struktury pobrano z bazy danych PDB.org

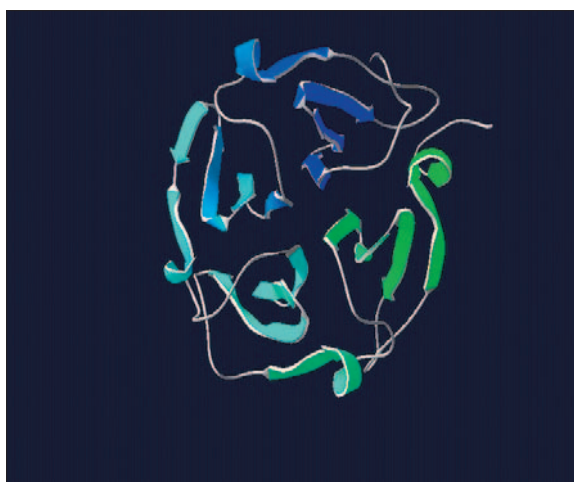
ne względem substratu, tzn. wiąże się z prawej do lewej strony zaczynając od N-końca (ryc. 4). Cynk katalityczny jest stabilizowany przez resztę Cys92 oraz mostek solny utworzony pomiędzy Arg91 i Asp96. Kieszonki S1' oraz S2' nie są obsadzone przez prodomenę [16].

Domena hemopeksyny

Domena hemopeksyny swą nazwę zawdzięcza analogii sekwencji do hemopeksyny – białka wiążącego i transportującego hem. Domena hemopeksyny ma kształt elipsoidalnego dysku złożonego z czterech symetrycznie ułożonych części powstałych z β wstążek. Tylko MMP-7, -26 i -23 nie zawierają tej domeny, metaloproteinaza MMP-12 traci domenę hemopeksyny krótko po aktywacji i nie ma to wpływu na jej aktywność [16]. Jednak wykazano, że w niektórych przypadkach jest ona istotna do prawidłowego rozpoznania substratu a w podrodzynie kolagenaz jest ona konieczna, aby mógł zaistnieć proces trawienia superhelisy kolagenowej. Sama domena katalityczna nie jest w stanie hydrolizować kolagenu, jest natomiast możliwe trawienie „żelatynopodobnych” peptydów [17]. Inną ważną funkcją tej domeny jest zdolność do wiązania tkankowego inhibitora metaloproteinaz TIMP (tissu inhibitor of metalloproteinases) przez MMP-9. Wykazano również, że jest ona istotna do aktywacji proMMP-2 [29]. W niektórych metaloproteinazach wykryto obecność w domenie hemopeksyny jonów wapnia, sodu i chloru w centralnym kanale, co sugeruje, iż mogą one brać udział w stabilizacji enzymu [7].

„Elastyczny łącznik”

Domena katalityczna jest połączona z domeną hemopeksyny przez elastyczny łącznik zbudowany z 15–65 aminokwasów. Jest on istotnym składnikiem utrzymującym stabilną strukturę cząsteczki enzymu, ale i też wydaje się mieć istotne znaczenie przy degradacji niektórych substratów metaloproteinaz, takich jak np. kolagen przez kolagenazy, gdzie wymagana jest współpraca jednostki katalitycznej z jednostką hemopeksyny. Niedawno wykazano,



Ryc. 5. Domena hemopeksyny MMP-9; korzystano z programu Swiss PDB. Współrzędne struktury pobrano z bazy danych PDB.org

że sam łącznik może uczestniczyć w wiązaniu się z kolagenem i ułatwiać jego degradację [26].

AKTYWACJA proMMP

Jak już wcześniej wspomniano MMP są syntetyzowane w postaci nieaktywnych zymogenów (proMMP). Aktywacja MMP odbywa się przez usunięcie prodomeny, w wyniku czego następuje odsłonięcie miejsca aktywnego enzymu. MMP mogą być aktywowane przez inne proteazy lub czynnikami chemicznymi np. $HgCl_2$, utleniony glutation, SDS. Także niskie pH oraz podwyższona temperatura prowadzą do aktywacji MMP. Większość z tych perturbentów działa poprzez zakłócanie oddziaływań cysteina – cynk katalityczny w obrębie przełącznika cysteinowego. Badania nad aktywacją proMMP-3 za pomocą związków rtęci wykazały, iż początkowo jest to proces raczej intramolekularny niż intermolekularny, w wyniku którego dochodzi do inicjującej aktywację hydrolizy w propeptydzie. W następnym etapie w wyniku oddziaływań z wygenerowanym stanem pośrednim następuje usunięcie propeptydu i odsłonięcie miejsca aktywnego [19].

Proteolityczna aktywacja MMP w wielu przypadkach jest procesem wielostopniowym. Początkowy atak proteolityczny odbywa się na eksponowaną pętlę znajdującą się między drugą a pierwszą helisą w prodomenie, w specyficznym miejscu (bait region). W wyniku tego następuje usunięcie części propeptydu i potem prawdopodobnie dochodzi do destabilizacji pozostałej części prodomeny. Zakłócone zostają oddziaływania między przełącznikiem cysteinowym a cynkiem znajdującym się w miejscu aktywnym i dochodzi do wewnątrzcząsteczkowych zmian prowadzących do powstania częściowo aktywnego stanu przejściowego, który ulega autoaktywacji przez usunięcie fragmentu prodomeny.

Proteolitycznie MMP aktywują inny enzym z tej rodziny i plazminę, która aktywuje między innymi proMMP-1,-3,-9,-10 i -13 [20].

Aktywacja wewnątrzkomórkowa

Mimo iż większość MMP aktywowanych jest poza komórką wykazano, że część z nich aktywowana jest wewnątrz-



komórkowo w aparacie Golgiego. Należą do nich MMP, które zawierają swoistą sekwencję znajdującą się przy końcu C-prodomeny (furin recognition sequence) KX(R/K)R. MMP-1 była pierwszą metaloproteinazą, w której wykryto tę sekwencję oraz stwierdzono aktywację wewnątrzkomórkową, oprócz niej podobną sekwencję mają wszystkie błonowe MMP oraz MMP-21.

Aktywacja proMMP-2 na powierzchni komórkowej

Inną jest aktywacja zachodząca na powierzchni komórki przez transbłonowe MMP (MT-MMP). Przykładem enzymu aktywowanego w ten sposób jest proMMP-2, proces ten zachodzi pod wpływem jednej z sześciu MT-MMP z wyjątkiem MT4-MMP (MMP-17). Szczególnie dobrze poznano aktywację przez MT1-MMP. Wyjątkowość tego procesu polega na tym, iż wymagany jest tutaj tkankowy inhibitor metaloproteinaz TIMP-2 (*t*issu *i*nhibitor of *m*etalloproteinases). Proces ten zachodzi wielostopniowo, w pierwszym etapie następuje dimeryzacja MT1-MMP, następnie w tak powstałym kompleksie do jednego z monomerów wiąże się TIMP-2 w taki sposób, że jego N koniec wiąże się z miejscem aktywnym jednej z MT-MMP. Drugi pozostaje wolny i tak powstały kompleks staje się receptorem proMMP-2, który wiąże się poprzez oddziaływanie domeny hemopeksyny z częścią C-kończącą TIMP-2. Powstały kompleks, tj. MT1-MMP-TIMP-2-proMMP-2 przyjmuje konformację, w której prodomena z proMMP-2 może być narażona na atak proteolityczny ze strony drugiej (niezwiązanej z TIMP wchodzącej w skład dimeru MT1) MMP prowadząc do proteolitycznej aktywacji enzymu. Alternatywny sposób aktywacji zakłada najpierw powstanie kompleksu TIMP-2-proMMP-2, a dopiero w następnym etapie wiązanie tak powstałego kompleksu do MT1-MMP i jego dimeryzację [29]. Ponadto wykazano, że aktywacja proMMP-2 przez MT2-MMP jest niezależna od TIMP-2. Wykazano również, że TIMP-4 wiąże się do domeny hemopeksyny proMMP-2, oraz że inhibituje MT1-MMP, ale nie ma wpływu na aktywację proMMP-2 [29].

ENDOGENNE INHIBITORY MMP

TIMP (*t*issu *i*nhibitor of *m*etalloproteinases), są endogennymi białkowymi inhibitorami metaloproteinaz. Dotąd odkryto u kręgowców inhibitory z rodziny TIMP odpowiednio od TIMP-1 do TIMP-4, ich ekspresja jest kontrolowana podczas rozwoju i różnicowania tkanek. Często w warunkach patologicznych, w których obserwuje się wzrost aktywności MMP, jednocześnie spada poziom TIMP bezpośrednio odpowiedzialnych za aktywność MMP.

Struktura TIMP

Masa TEMP waha się 21-29 kDa, są one zbudowane z dwóch podjednostek (domen), N-końcowej oraz C-końcowej, mających odpowiednio po około 125 i 65 aminokwasów, w każdej podjednostce występują po trzy pary konserwatywnie usytuowanych mostków disiarczkowych [18]. Kompletna struktura TIMP-1 oraz mechanizm inhibicji TIMP-1-MMP-3 zostały poznane dzięki wykorzystaniu technik krystalografii rentgenowskiej. Ogólny kształt TIMP przypomina klin, który podobnie jak substrat wnika w miejsce aktywne enzymu. Głównym miejscem wiązania się TIMP-2 z MMP jest N-końcowa domena. Szczególną

rolę odgrywają reszty czterech pierwszych aminokwasów N-końcowej domeny, które są odpowiedzialne za oddziaływanie z miejscem aktywnym enzymu. Aminokwasy pierwszy i trzeci są silnie konserwatywnymi cysteinami, które tworzą wewnątrzłańcuchowy mostek disiarczkowy, a ponadto reszta Cys 1 bierze udział wraz z grupą karbonylową oraz α -aminową końca N w chelataowaniu cząsteczki cynku katalitycznego w taki sposób, że nie może dojść do aktywacji cząsteczki wody [16].

Swoistość TIMP

Inhibitory z rodziny TIMP hamują wszystkie testowane MMP. Wyjątkiem jest TIMP-1, który nie hamuje MT1-MMP. Spośród wszystkich czterech inhibitorów wyróżnia się TIMP-3, który jest efektywniejszym inhibitorem dla ADAM-17 (TACE), ADAM-10 oraz ADAM-12, niż dla MMP [16].

Inne funkcje TIMP

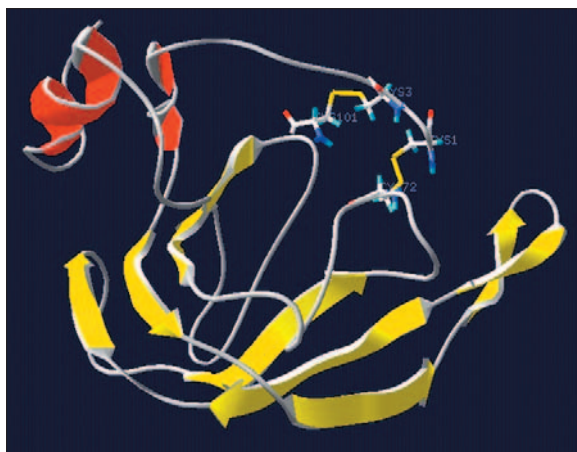
Poza hamowaniem aktywności enzymów wykazano także wiele innych właściwości biologicznych TIMP. TIMP-1 i TIMP-2 mają właściwości promotora wzrostu komórek. TIMP-1 wykryto m.in. w jądrach fibroblastów oraz na powierzchni komórek raka piersi MCF-7 [22]. TIMP-2 hamuje wzrost komórek śródbłonna indukowanych przez zaskadowy czynnik wzrostu fibroblastów [1]. TIMP-3 z kolei ma właściwości proapoptotyczne, prawdopodobnie stabilizuje strukturę komórkowego receptora TNF- α i Fas [8], natomiast TIMP-1 oraz TIMP-2 wykazują właściwości antyapoptotyczne [6].

Inne białkowe inhibitory metaloproteinaz

Wykazano między innymi, że α -makroglobulina jest efektywniejszym inhibitorem MMP-1 niż TIMP-1 [10]. Poza tym wykazano, że wiele innych białek ma właściwości hamujące aktywność MMP (m.in. inhibitor zewnątrzpochoźnej drogi krzepnięcia krwi 2 będący inhibitorem proteaz serynowych) [10]. Stwierdzono, że fragment związanego z błoną prekursora β amyloidu wykazuje właściwości inhibitoryczne względem MMP-2. RECK, związana z GPI glikoproteina obniża aktywność MMP-9 oraz MMP-2, upośledzając angiogenezę. Wykazano także, że chlorotoksyna, którą wyizolowano z toksyny skorpionia inhibituje MMP-2 [29].

WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE MMP

Główną rolą MMP jest degradowanie białek macierzy pozakomórkowej: kolagenu, lamininy, proteoglikanów czy fibronektyny, co przekłada się na ułatwienie migracji komórek. Jednak ECM nie jest tylko biernym rusztowaniem tkanki, ale jest także rezerwuarem licznych czynników wzrostu, które uwolnione przez MMP mogą wpływać na komórki. Poza ECM substratami MMP są różnego rodzaju molekuly znajdujących się na powierzchni komórek. Mogą one uczestniczyć w procesie formułowania receptorów komórkowych oraz w procesach immunologicznych. Dlatego funkcji MMP nie można upraszczać tylko do prostej degradacji ECM. W warunkach fizjologicznych MMP kontrolują takie procesy jak angiogeneza, embriogeneza czy przebudowa tkanek. W wielu stanach patologicznych, ta-



Ryc. 6. Struktura przestrzenna tkankowego inhibitora metaloproteinaz 2, TIMP-2; kolorem żółtym zaznaczono N – domenę, czerwonym C – domenę. Na ilustracji widać także konserwatywne cysteiny w N – domenie. Współrzędne struktury pobrano z bazy danych PDB.org

kich jak nowotwory, choroba Alzheimera czy choroby sercowo-naczyniowe, MMP wykazują nadmierną aktywność stając się istotnym graczem w stanach patologicznych i fizjologicznych [11].

Degradacja białek macierzy pozakomórkowej ECM

Jak już wcześniej wspomniano podstawową funkcją MMP jest degradacja macierzy pozakomórkowej i/lub błony podstawnej zbudowanej m.in. z kolagenów, elastyny, fibronektyny, agrekanów, entaktyny oraz tenascyny, które są substratami MMP. Degradacja znosi fizyczne i strukturalne bariery, umożliwiając tym samym migrację komórek zarówno w warunkach prawidłowych jak i patologicznych.

Liczne składniki macierzy są ligandami komórkowych receptorów adhezyjnych, integryn, które uczestniczą w przekazywaniu sygnałów do wnętrza komórki. Wynika z tego, iż białka ECM poprzez aktywność MMP kontrolują wiele istotnych procesów komórkowych, takich jak proliferacja, migracja, różnicowanie się oraz adhezja. Jedną z najistotniejszych funkcji MMP, a dokładniej MMP-2 oraz MMP-9 jest degradacja kolagenu typu IV, który jest głównym składnikiem naczyniowej błony podstawnej. Wynikiem degradacji kolagenu typu IV jest zniszczenie fizycznej bariery uniemożliwiającej komórkom migrację, dzięki czemu możliwa jest migracja leukocytów podczas stanów zapalnych oraz komórek uczestniczących w procesie morfogenezy. Cecha ta także jest odpowiedzialna za procesy, takie jak angiogeneza, proces miejscowego wzrostu nowotworów i powstawanie przerzutów. Dlatego enzymy z grupy MMP są przedmiotem zainteresowania w poszukiwaniu powiązań i stawianiu hipotez związanych z terapią przeciwnowotworową.

ECM jest rezerwuarem licznych czynników wzrostu, które są uwalniane w wyniku degradacji ECM. Przykładem jest transformujący czynnik wzrostu β – TGF- β , który jest związany dekoryną, utrzymującą integralność tkanek poprzez oddziaływanie z fibronektyną i trombospondyną. W wyniku degradacji dekoryny następuje uwolnienie TGF- β , któ-

rego jedną z funkcji jest regulacja ekspresji genu kodującego MMP. W procesie degradacji dekoryny uczestniczą m.in. MMP-2, -3 i -7 [11,27,29].

Innym istotnym zjawiskiem wywołanym degradacją ECM przez MMP jest zniszczenie oddziaływań adhezyjnych między komórką a macierzą, co sprawia, że komórka zostaje odizolowana od sygnałów z otoczenia. Przykładem jest inwolucja niektórych organów np. ogona kijanki. Redukcja masy ogona wywołana degradacją ECM prowadzi do śmierci komórek.

Degradacja ECM nadaje komórkom zdolność do migracji. W wyniku hydrolizy ECM mogą zostać odsłonięte normalnie niedostępne regiony makrocząsteczek. Na przykład indukowana przez MT1-MMP oraz MMP-2 migracja komórek śródbłonna wywołana jest hydrolizą swoistej sekwencji lamininy 5, z którą oddziałuje receptor integrynowy α 3 β 1. W ten sposób MMP ekspozując ukryty region nadają komórkom śródbłonna zdolność do migracji [11,29].

Jak już wcześniej wspomniano MMP oprócz zdolności do degradacji macierzy pozakomórkowej degraduje wiele innych białek i peptydów. MMP ze względu na usytuowanie degradują liczne receptory na powierzchni komórki. Hydrolizują także molekuly uwalniane z błony komórkowej, przez co mogą aktywować i inaktywować wiele czynników wzrostu, cytokin i chemokin. Przykładem aktywacji czynników wzrostu przez MMP jest aktywacja insulinopodobnego czynnika wzrostu IGF-1. IGF-1 i IGF-2 uczestniczą w procesach różnicowania się komórek i proliferacji, jest także molekułą regulującą liczne procesy metaboliczne. Istotne jest to, że w osoczu prawie cała populacja IGF występuje w postaci związanej z białkami wiążącymi insulinopodobny czynnik wzrostu. Wiele informacji wskazuje, że to właśnie MMP odgrywa główną rolę w degradacji kompleksu IGF-BP i uwalnianiu IGF [11].

Czynnik martwicy nowotworu TNF- α syntetyzowany w postaci białka błonowego o masie 26 kDa, aby mógł stać się aktywną cytokiną wymaga proteolitycznej aktywacji. Wykazano, iż aktywację TNF- α może przeprowadzać wiele MMP, przy czym najistotniejszym z enzymów aktywujących jest ADAM-17, blisko spokrewniony z rodziną enzymów MMP [11,29]. Czynnik martwicy nowotworu TNF- α odpowiada m.in. za stymulację fagocytozy, proliferację limfocytów T i B, zwiększenie toksyczności komórek NK i stymuluje ekspresji licznych MMP.

Istotną właściwością MMP jest zdolność do formułowania receptorów błonowych. MMP-2 hydrolizując wiązanie peptydowe w receptorze 1 czynnika wzrostu fibroblastów uwalnia jego ektodomenę zdolną do wiązania FGF (fibroblastyczny czynnik wzrostu). MMP-9 z kolei formułuje receptor α IL-2 (receptor interleukiny 2) umiejscowiony na powierzchni limfocytów T, przez co obniża ich zdolność do odpowiedzi na interleukinę 2. Proces ten sprzyja rozwojowi nowotworów, gdyż hamuje zdolność do infiltracji guza przez limfocyty T [11].

MMP aktywują także wiele chemokin. Pierwszą grupą są chemokiny z rodziny CXC, czyli takie, w których dwie pierwsze z czterech konserwatywnych cystein w sekwen-



cji pierwszorzędowej są przedzielone przez inny aminokwas. Do tej grupy chemokin należy m.in. IL-8 aktywowana przez MMP-9. Aktywacja IL-8 zachodzi w wyniku odciążenia krótkiej sekwencji aminokwasów znajdujących się na początku N-końca IL-8. Innymi chemokinami aktywowanymi przez MMP są m.in.: czynnik płytkowy (PF-4), pochodzący z komórek peptyd aktywiający tkankę łączną (CTAP-III) oraz pochodzący z komórek śródbłonna peptyd aktywiający granulocyty obojętnochłonne [11].

MMP mogą być także aktywatorami chemokin z rodziny CC, czyli takich w których dwie pierwsze z czterech konserwatywnych cystein nie są od siebie oddzielone innym aminokwasem. Przykładem takiej chemokiny aktywowanej przez MMP (MMP-2) jest MCP-3. MCP-3 jest silnym antagonistą receptorów chemokin CC, CCR-1, -2, -3. Ciekawe jest to, że MCP-3 nie jest aktywowany przez MMP syntetyzowane przez granulocyty obojętnochłonne, czyli przez MMP-8 i MMP-9.

MMP w procesie angiogenezy

MMP są istotnymi enzymami promującymi angiogenezę. Aby mogła wystąpić inwazja proliferujących komórek konieczna jest degradacja ECM, w której uczestniczą MMP. Wykazano, że tylko nieobecność jednej metaloproteinazy u myszy, a mianowicie MT1-MMP wywołuje wiele zaburzeń angiogenezy. Wykazano także nadmierną ekspresję MMP w proliferacyjnych komórkach śródbłonna, co przekłada się na proces angiogenezy. MMP hydroлизują ektodomenę E-kadheryny przez co zmniejszają adhezję komórek i wpływając na angiogenezę. Biorą one też udział w procesie hydrolizy integrzyn. Innym sposobem promowania angiogenezy jest degradacja czynników antyangiogennych, takich jak nabłonkowy barwnik siatkówki (PEDF), który jest silnym inhibitorem angiogene-

zy [11]. Zdolność do stymulacji angiogenezy przez MMP wynika przede wszystkim z ich możliwości aktywowania czynnika wzrostu śródbłonna naczyń VEGF oraz zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów bFGF. Z kolei VEGF oraz bFGF indukują ekspresję MMP w komórkach śródbłonna [29]. Jednak MMP mogą także uczestniczyć w procesach antyangiogennych np. poprzez degradację prolaktyny, której N-końiec jest silnym inhibitorem angiogenezy. W stanach prawidłowych aktywność MMP w procesie angiogenezy jest ściśle kontrolowana przez endogenne inhibitory, takie jak TIMP i przez kontrolę ekspresji genów.

MMP W STANACH PATOLOGICZNYCH

Jak już wcześniej wspomniano wzrost aktywności MMP towarzyszy wielu chorobom, takim jak choroby sercowo-naczyniowe, choroba Alzheimera, choroby autoimmunologiczne, choroby nowotworowe. Przedmiotem szczególnej zainteresowania było poznanie wpływu metaloproteinaz na proces unaczyniania nowotworu (neoangiogenezy) oraz na proces przerzutowania nowotworów [9,11,27].

PODSUMOWANIE

Powyższe dane wskazują na niezwykle szeroki zakres funkcji MMP. Ich działanie nie sprowadza się wyłącznie do „ślepej” degradacji biernego rusztowania macierzy pozakomórkowej. Powiązania aktywności MMP z tak wieloma procesami fizjologicznymi, takimi jak apoptoza, angiogeneza, migracja komórek etc., które często są ściśle związane ze stanami patologicznymi doprowadziły do licznych badań nad tą grupą enzymów. Istotną zwłaszcza wydaje się próba znalezienia inhibitorów dla poszczególnych MMP i/lub wybiórcze hamowanie aktywności enzymów w miejscu docelowym.

PIŚMIENICTWO

- [1] Ahonen M., Poukkula M., Baker A.H., Kashiwagi M., Nagase H., Eriksson J.E., Kähäri V.M.: Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 induces apoptosis in melanoma cells by stabilization of death receptors. *Oncogene*, 2003; 22: 2121–2134
- [2] Aimes R.T., Quigley J.P.: Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase: inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270: 5872–5876
- [3] Ala-aho R., Kähäri V.M.: Collagenases in cancer. *Biochimie.*, 2005; 87: 273–286
- [4] Allan J.A., Docherty A.J., Barker P.J., Huskisson N.S., Reynolds J.J., Murphy G.: Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. *Biochem J.* 1995; 309: 299–306
- [5] Bode W., Fernandez-Catalan C., Tschesche H., Grams F., Nagase H., Maskos K.: Structural properties of matrix metalloproteinases. *Cell. Mol. Life Sci.*, 1999; 55: 639–652
- [6] Cawston T.E., Mercer E.: Preferential binding of collagenase to α 2-macroglobulin in the presence of the tissue inhibitor of metalloproteinases. *FEBS Lett.*, 1986; 209: 9–12
- [7] Gohlke U., Gomis-Rüth F.X., Crabbe T., Murphy G., Docherty A.J., Bode W.: The C-terminal (haemopexin-like) domain structure of human gelatinaseA (MMP-2): structural implications for its function. *FEBS Lett.*, 1996; 378: 126–130
- [8] Guedez L., Courtemanch L., Stetler-Stevenson M.: Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 induces differentiation and an antiapoptotic phenotype in germinal center B cells. *Blood*, 1998; 92: 1342–1349
- [9] Handsley M.M., Edwards D.R.: Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. *Int. J. Cancer.*, 2005; 115: 849–860
- [10] Herman M.P., Sukhova G.K., Kisiel W., Foster D., Kehry M.R., Libby P., Schonbeck U.: Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implications for atherosclerosis. *J. Clin. Invest.*, 2001; 107: 1117–1126
- [11] Hrabec E., Naduk J., Stręk M., Hrabec Z.: Kolagenazy typu IV (MMP-2 i MMP-9) i ich substraty – białka macierzy pozakomórkowej, hormony, cytokiny, hemokiny i ich receptory. *Post. Biochem.*, 2007; 53: 37–45
- [12] Itoh T., Ikeda T., Gomi H., Nakao S., Suzuki T., Itoharu S.: Unaltered secretion of amyloid precursor protein in gelatinase A (matrix metalloproteinase 2)-deficient mice. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 22389–22392
- [13] Kolb C., Mauch S., Peter H.H., Krawinkel U., Sedlacek R.: The matrix metalloproteinase RASI-1 is expressed in synovial blood vessels of a rheumatoid arthritis patient. *Immunol. Lett.*, 1997; 57: 83–88
- [14] Li W., Gibson C.W., Abrams W.R., Andrews D.W., DenBesten P.K.: Reduced hydrolysis of amelogenin may result in X-linked amelogenesis imperfecta. *Matrix Biol.*, 2001; 19: 755–760
- [15] Lohi J., Wilson C.L., Roby J.D., Parks W.C.: Epilysin, a novel human matrix metalloproteinase (MMP-28) expressed in testis and keratinocytes and in response to injury. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 10134–10144
- [16] Maskos K.: Crystal structures of MMPs in complex with physiological and pharmacological inhibitors. *Biochimie*, 2005; 87: 249–263
- [17] Murphy G., Allan J.A., Willenbrock F., Cockett M.I., O'Connell J.P., Docherty A.J.: The role of the C-terminal domain in collagenase and stromelysin specificity. *J. Biol. Chem.*, 1992; 267: 9612–9618

- [18] Murphy G., Houbrechts A., Cockett M.I., Williamson R.A., O'Shea M., Docherty A.J.: The N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity. *Biochemistry*, 1991; 30: 8097–8102
- [19] Nagase H.: Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem.*, 1997; 378: 151–160
- [20] Pei D., Weiss S.J.: Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin 3 zymogen. *Nature*, 1995; 375: 244–247
- [21] Pepper M.S.: Extracellular proteolysis and angiogenesis. *Thromb. Haemost.*, 2001; 86: 346–355
- [22] Ritter L.M., Garfield S.H., Thorgeirsson U.P.: Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) binds to the cell surface and translocates to the nucleus of human MCF-7 breast carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999; 257: 494–499
- [23] Rundhaug J.E.: Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J. Cell. Mol. Med.*, 2005; 9: 267–285
- [24] Shapiro S.D., Kobayashi D.K., Ley T.J.: Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. *J. Biol. Chem.*, 1993; 268: 23824–23829
- [25] Suzuki K., Enghild J.J., Morodomi T., Salvesen G., Nagase H.: Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). *Biochemistry*. 1990; 29: 10261–10270
- [26] Tam E.M., Moore T.R., Butler G.S., Overall C.M.: Characterization of the distinct collagen binding and cleavage mechanisms of matrix metalloproteinase 2 and 14 (gelatinaseA and MT1-MMP): the differential roles of the MMP hemopexin C domains and the MMP-2 fibronectin type II modules in collagen triple helicase activities. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 43336–43344
- [27] Uria J.A, López-Otín C.: Matrilysin-2, a new matrix metalloproteinase expressed in human tumors and showing the minimal domain organization required for secretion, latency, and activity. *Cancer Res.*, 2000; 60: 4745–4751
- [28] Velasco G., Pendas A.M., Fueyo A., Knäuper V., Murphy G., López-Otín C.: Cloning and characterization of human MMP-23, a new matrix metalloproteinase predominantly expressed in reproductive tissues and lacking conserved domains in other family members. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 4570–4576
- [29] Visse R., Nagase H.: Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.*, 2003; 92: 827–839

