

Strukturelle determinanter for selektiv inhibering av matrix metalloproteinaser

5. års oppgave for:

Magne Kolstad Hansen

Kull –97

Veileder:

Ingebrigt Sylte

Professor, avdeling for farmakologi, det
medisinske fakultet

Tromsø, 28.08.2002

RESYMÈ

Denne oppgaven tar for seg matrix metalloproteinaser, som er en spesiell gruppe av metalloenzymer og kan tenkes å ha en sentral rolle i den proteolytiske effekten på basalmembranen.

Ved tumor invasjon og metastasering observeres svært høy MMP ekspresjon og aktivitet. Håpet er at man vil kunne finne stoffer som inhiberer MMP subtype-spesifikt slik at man kan hemme metastase- prosessen.

Vi har studert geometrien i seks metalloproteinaser (MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8 og MMP13), og målt interatomære avstander i det katalytiske setet.

Videre har vi foreslått bruk av struktur analoger av α -Bromo- β (5-imidazolyl)-propion syre som inhibitorer av MMP`er.

Resultatene tyder på at det vil være vanskelig å lage subtype spesifikke inhibitorer. I så fall må sekundære bindings seter i enzymet inkluderes.

Aminosyren tilsvarende posisjon 129 i MMP3 (phe) kan være interessant i denne sammenheng.

Innholdsfortegnelse

1.0 Introduksjon

1.1 Tumor-invasjon og metastasering

1.2 MMP

1.2.1 Matrix metalloproteinase familien

1.2.2 MMP – inndeling og spesifisitet

1.2.3 MMP – struktur

1.2.4 Regulering av MMP

1.2.5 Aktivering av MMP

1.2.6 Vevs-inhibitorer av MMP (TIMP)

1.2.7 MMP og cancer

1.2.8 TIMP og cancer

1.2.9 Angiogenese, MMP og TIMP

1.3 Molekyl modellering

1.3.1 Molekyl mekanikk (MM)

1.3.2 Energiminimalisering

1.3.3 Molekyl-dynamikk (MD) simuleringer

2.0 Mål med oppgaven

3.0 Metoder

3.1 Software

3.1.1 AMBER

3.1.2 MIDAS plus

3.1.3 Databaser / servere

3.2.4 ClustalW

3.2 Konstruksjon av MMP modeller

3.2.1 Database og PDB-filer

3.2.2 Raffinering

3.3 Måling av interatomære avstander

3.4 "Docking" av ligand inn i MMP3 (katalytisk område)

4.0 Resultater

5.0 Diskusjon

6.0 Konklusjon

7.0 Litteratur referanser

1.0 Introduksjon

En kreftcelles interaksjon med basalmembranen anses å være svært sentral i initieringen av metastase-kaskaden, og danner grunnlaget for tumorinvasjon.

Basalmembranen fungerer også som barriere ved flere anledninger senere i metastaseringen, for eksempel ved vaskulær infiltrasjon.

Degraderingen av basalmembran-komponenter er dermed en sentral proteolytisk prosess ved metastasering og angiogenese.

Matrix metalloproteinaser (MMP) , en spesiell gruppe av metalloenzymer som bryter ned ekstracellulær-matrix, tenkes å ha en viktig rolle i den proteolytiske effekten på basalmembranens type-IV kollagen (1).

De endogene inhibitorene eller vevsinhibitorene av MMP er også sentrale. Ved tumor-invasjon og metastasering observeres svært høy MMP ekspresjon og aktivitet. Man håper dermed at man skal finne stoffer (ligander) som inhiberer MMP subtype-spesifikt slik at man kan hemme metastase-prosessen (1).

1.1 Tumor-invasjon og metastasering

De eksakte mekanismene for invasjon og metastasering er ikke kjent, men minst tre kritiske trinn er med i prosessen (1).

1. Tumorcellen fester seg til ekstracellulær-matrix (ECM) – mediert via eksisterende eller nydannede kontaktpunkter.
2. Igangsette proteolytisk effekt i ECM.
3. Migrering gjennom det proteolytisk modifiserte ECM.

Benigne tilstander karakteriseres av en inntakt og kontinuerlig basalmembran som atskiller normalt og dysplastisk vev. Invasive carcinomer har i motsetning en diskontinuerlig basalmembran med soner av ECM-tap rundt de invaderende tumorcellene.

Sentralt i den proteolytiske prosessen står matrix metalloproteinasene (MMP). Dette er ekstracellulære metalloenzymer som bryter ned ECM.

1.2 MMP

1.2.1 Matrix metalloproteinase familien

MMP er en familie av zink-atom avhengige endopeptidaser. De virker spesifikt og selektivt på mange av komponentene i ekstracellulær matrix. Matrix metalloproteinasene produseres som pro-enzymmer og aktiveres siden ved at pro-fragmentet kappes av.

1.2.2 MMP – inndeling og spesifisitet

Matrix metalloproteinasene utgjør 17 forskjellige enzymer. Disse er inndelt i 4 hovedgrupper utifra substratspesifisitet (2):

1. Kollagenaser
2. Stromelysiner
3. Gelatinaser
4. Membrantype –MMP`er

Kollagenasene utgjør interstitiell kollagenase (MMP1), neutrofil kollagenase (MMP8) og kollagenase-3 (MMP13). Disse degraderer fibrillære interstitielle kollagener.

Stromelysinene utgjør STR-1 (MMP3), STR-2 (MMP10), STR-3 (MMP11) og matrilysin (MMP7). Disse degraderer fibronektiner, laminin, elastin, proteoglykaner og kollagener.

Gelatinasene utgjør MMP2 og MMP9. Disse degraderer denaturerte kollagenfibriller og type IV kollagen i basalmembranen.

De membranbundne MMP`ene er de siste beskrevne og heter MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP og MT4-MMP. Type 1 og 3 aktiverer progelatinase A. Type 2 og 4 har ennå ikke definert aktivitet.

MMP`ene har følgende fellestrekk:

1. Den katalytiske mekanismen avhenger av sink i det aktive setet, samt krever en metallisk kofaktor, kalsium.

2. De utviser sekvens homologi.
3. De fleste utskilles som proenzymmer og aktiveres ved proteolytisk kløyvning.
4. De hemmes av spesifikke metalloprotease vevsinhibitorer, TIMP`er.
5. De degraderer en eller flere av komponentene til den ekstracellulære matrix.

1.2.3 MMP – struktur

MMP`ene kan klassifiseres utifra følgende funksjonelle proteindomener: Katalytisk domene, en prolinrik "hinge" region, hemopexin og vitronektinlignende karboksy-terminal domene, pre-domene inneholdende signalsekvens og propeptid-domene som kløyves ved aktivering (3).

Alle MMP`er, bortsett fra matrilysin, inneholder et karboksyl-terminal hemopexin/ vitronektin-lignende domene som har forskjellig funksjon i de forskjellige MMP`er. I pro-MMP2 og pro-MMP9 medierer det interaksjoner med spesifikke proteinasehemmere. I MMP1 og MMP8 er det assosiert med hemmer og substrat binding. "Hinge" regionen er viktig for bestemmelse av substratspesifisitet.

Samtlige MMP`er inneholder et katalytisk domene som inneholder 3 histidiner og et sink bindende sete som utgjør det aktive setet. MMP2 og MMP9 inneholder i tillegg en region mellom det katalytiske domene og "hinge" regionen som er homolog til den kollagenbindende regionen av fibronektin. Denne regionen er trolig essensiell for MMP2 kollagen binding og kløyving.

Sink atomet koordineres av tre histidiner (HIS) og et glutamat (GLU). De interatomære avstandene mellom HIS og GLU, og avstandene mellom sink og HIS og GLU er viktige når en skal konstruere ligander som kan være potensielle hemmere.

1.2.4 Regulering av MMP

Maligne celler har økt proteolytisk aktivitet og migrerer raskt gjennom matrix-barrierer. Dette er et viktig grunnlag for cellenes invasive evne. En streng regulering er nødvendig for å holde balanse mellom disse invasive prosessene.

MMP sin rolle i degradering av ECM kan reguleres på flere nivåer, blant annet transkripsjon, translasjon, pro-enzym aktivering, inaktivering ved endogene inhibitorer og degradering eller fjerning av aktivt enzym (1).

På transkripsjonsnivå reguleres flere MMP av cytokiner, vekstfaktorer og hormoner. Disse regulatorene kan både hemme og fremme MMP produksjon.

1.2.5 Aktivering av MMP

Biokjemien ved MMP aktivering er godt kjent fra flere in vitro studier (1). Mekanismen for MMP aktivering hos pattedyr refereres også til som "cystein skifte" (1). I denne mekanismen koordineres et uparret cystein-residu i pro-fragmentet med sink-atomet i det aktive setet. Når denne cystein-sink atom interaksjonen forstyrres av kjemiske eller fysiske faktorer, oppstår en konformasjonsendring med påfølgende proteolytisk kløyving av pro-fragmentet.

En klar forståelse av den biologiske aktiveringen av MMP er derimot ennå ikke klarlagt. Det er også foreslått mulige veier for in vivo aktivering av MMP (1), men det blir ikke gått nærmere inn på disse her.

1.2.6 Vevs-inhibitorer av MMP (TIMP)

Alle medlemmene av MMP familien kjennetegnes også ved at de hemmes av en gruppe endogene inhibitorer, også kjent som vevs-inhibitorene av metalloproteinase. Balansen mellom nivået av aktiverte MMP og nivået av frie TIMP avgjør netto MMP aktivitet. Ved å endre dette equilibrium, påvirker man graden av cellulær invasjon.

Flere TIMP molekyler har blitt isolert, klonet og karakterisert fra flere arter. Selv om TIMP molekylene inhibitoriske aktiviteter på mange måter overlapper hverandre, er de immunologisk distinkte, kodes av gener fra forskjellige kromosomer og gen-ekspressjonen er uavhengig regulert.

Studier av TIMP indikerer at hver inhibitor har en spesifikk og distinkt funksjon.

1.2.7 MMP og cancer

En rekke studier har gitt resultater som tyder på at MMP enzymer spiller en rolle i tumorinvasjon og metastasering. Flere metoder er benyttet for å måle tilstedeværelsen av MMP i tumorvev fra menneske og i serum fra cancerpasienter (1):

1. Lokalisering av MMP i tumor vev ved immunoperoxidase merking.

2. Northern blot analyse av MMP transkripsjoner i RNA prøver isolert fra tumor vev.
3. Lokalisering av MMP transkripsjon i vev ved in situ hybridisering.
4. Måling av MMP nivåer i kroppsvæsker hos cancerpasienter.

Man har funnet en positiv korrelasjon mellom MMP uttrykk og tumorinvasjon/metastase in vitro så vel som in vivo i dyremodeller.

MMP assosieres med den maligne phenotype i en rekke vev hos mennesket: lunge, prostata, magesekk, colon, mammae, ovarier og thyroidea.

1.2.8 TIMP og cancer

Flere studier korrelerer lavt TIMP uttrykk med økte invasive og metastaserende egenskaper hos tumorceller (1). Forstyrrelse av endogen TIMP-1 produksjon ga økt invasiv adferd i embryonale stamceller. Ved å addere exogen TIMP-1 reverserte man denne adferden.

1.2.9 Angiogenese, MMP og TIMP

Invasjon av tumorceller og angiogenese har en rekke funksjonelle likheter. I begge prosessene kreves det at de invaderende cellene fester til en basalmembran, etterfulgt av dannelsen av en proteolytisk defekt i basalmembranen og migrering gjennom denne defekten.

Etter at de invaderende cellene krysser denne bindevevsbarrieren (basalmembranen), vil videre invasjon og proliferasjon gi enten et nytt karlumen eller et fokus for metastase.

I tillegg til disse likhetene virker det som om angiogenese og tumorvekst stimulerer hverandre. Dannelse av nye blodkar gjør at tumoren kan ekspandere i tre dimensjoner. Vaskulariseringen gir raskere tumorvekst og øker dessuten potensialet for metastasering. Tumorinvasjon og metastasering er således nært knyttet til angiogeneesen.

Forsøk har vist at man kan hemme angiogeneesen ved å tilsette eksogent TIMP (1).

På denne måten får man en dobbelt hemmende effekt av TIMP på tumorvekst og metastasering ved at man hemmer både angiogeneesen og de proteolytiske prosessene som skaper defekter i basalmembranen.

1.3 Molekyl modellering

For å finne den konformerer som er ansvarlig for en biologisk eller farmakologisk aktivitet, må man inneha informasjon om molekylets struktur og funksjon.

Både eksperimentelle og teoretiske teknikker brukes for å finne den konformerer som er ansvarlig for aktiviteten.

Molekylær modellering er generering, manipulering og/eller presentasjon av realistiske 3-dimensjonale molekylstrukturer. Det er et viktig verktøy, og gir opplysning om de kjemiske og fysiske egenskaper ved molekyl-mekaniske beregninger, kvante-mekaniske beregninger og molekyl-dynamikk beregninger (4).

Ved blant annet ligand-design og i studier av reseptor-ligand interaksjoner er molekyl-modellering et viktig verktøy.

1.3.1 Molekyl mekanikk (MM)

MM beskriver energien i et molekyl ved hjelp av en funksjon som tar høyde for avvik fra "ideelle" bindingsavstander og α -vinkler, og også van der Waals og elektrostatiske interaksjoner. Det beste hadde vært å bruke kvantemekaniske metoder i beregningene, men selv med de raskeste datamaskiner ville dette ha tatt uforholdsmessig lang tid.

Det er derfor nødvendig med tilnærminger for at MM skal kunne være et nyttig verktøy for energiberegninger av molekyler. I MM betraktes atomer som kuler av forskjellig størrelse som knyttes sammen av fjærer (bindinger) med ulike lengder. Det viktigste ved denne forenklingen er at den tillater beregning av den totale steriske energien i et molekyl. Den steriske energien beregnes fra bindingsstrekk-energi, vinkel-bøynings energi, torsjons-energi og ikke-bindende interaksjonsenergi (van der Waal energi og elektrostatisk energi). Molekyl mekanikk inkluderer energiminimalisering og molekylodynamikk simuleringer.

1.3.2 Energiminimalisering

For å finne den optimale molekyl-geometrien eller lav-energi konformasjoner i et molekylsystem, brukes minimalisering av molekyl-energien.

MM kan ikke krysse energibarrierer, og derfor kan man kun finne lokale energiminima.

1.3.3 Molekyl-dynamikk (MD) simuleringer

MD simulerer bevegelsen i et molekyl ved å kalkulere fluktuasjoner av atomer i molekylet som en funksjon av tiden. Dette gjør det mulig å studere for eksempel termisk mobilitet i molekyler og protein-ligand interaksjoner som ikke lar seg undersøke i statiske modeller.

Med MD kan man krysse energibarrierer mellom ulike konformasjoner og dermed finne mer optimale energiminima. Ofte heves temperaturen under simuleringen. Dette for at molekylet skal kunne krysse selv store energibarrierer slik at man kan søke blant flere mulige konformasjoner.

2.0 Mål med oppgaven

Målet med oppgaven er å finne strukturelle likheter og forskjeller i geometrien i det aktive setet mellom forskjellige MMP-er. Dette kan fortelle noe om strukturelle determinanter for subtype spesifikk binding til ulike MMP-er. Slik informasjon er viktig for utvikling av subtypespesifikke MMP inhibitorer. I denne oppgaven har derfor molekyl medelleringsteknikker blitt brukt til å kartlegge geometrien i det aktive setet til flere MMP`er.

3.0 Metoder

3.1 Software

3.1.1 AMBER

Amber er et felles navn for en gruppe programmer som lar brukeren blant annet utføre MD-simuleringer og energiminimaliseringer, spesielt på biomolekyler (5). Programpakken består av en rekke moduler som er lenket sammen med et sett filer. Amber programpakken ble brukt til energiminimaliseringer av krystallstrukturen av MMP`er.

PREP modulen lager eller adderer residuer til residu-databasen. Den definerer topologien i residuer; atom type, bindingsforhold og atomladning. Denne modulen er ikke nødvendig for residuer i den standardiserte Amber-databasen som inkluderer residuer for hver aminosyre og nukleinsyre.

LINK modulen definerer topologien i hele molekylet. Aminosyresekvenser kommer inn her, og topologien for hvert residu lenkes sammen og danner topologien for hele systemet.

EDIT modulen leser pdb koordinater og anvender dem på systemet generert av *LINK*.

PARM modulen legger til de rette parametere, atomer, bindinger og ikke-bindingende parametere til molekyl systemet. Til slutt skriver det ut koordinatfiler og topologifiler som trengs for *SANDER*, *ANAL* og *CARNAL*.

SANDER modulen er et molekyl-dynamikk (MD) program og et energiminimaliseringsprogram. Som beskrevet tidligere kan man med MD oppnå en konformasjon med lavere energi enn man oppnår med energiminimalisering alene.

ANAL er en modul for statistisk analyse. Den utfører energimessige og strukturelle analyser av statiske molekyler.

CARNAL er en modul for dynamisk analyse. Den brukes for geometriske beregninger, kalkulering av gjennomsnittlig bevegelse og r.m.s. koordinat tilpasning.

3.1.2 MIDAS plus

”Molecular Interactive Display and Simulation” er et interaktivt grafikk-program for framstilling og manipulering av macromolekyler slik som proteiner og nukleinsyrer (6). MIDAS plus ble brukt til visualisering av MMP strukturer og til ”docking” av α -Bromo- β (5-imidazolyl)-propion syre inn i det aktive setet til MMP3.

3.1.3 Databaser/servere

Som kilde for MMP-modeller brukte jeg www.merops.co.uk. Dette er en database som inneholder opplysninger om proteaser: Klaner, familier, sekvenser og struktur. Ved å velge ”struktur”, føres man til PDB- databasen – www.resb.org/pdb/. Alle pdb- filene brukt i oppgaven er hentet fra denne databasen. Tilgangen er gratis for akademiske og statlige institusjoner.

3.1.4 ClustalW

ClustalW er et aminosyresekvens ”alignment” program som gjør det mulig å sammenligne divergente aminosyresekvenser (7).

3.2 Konstruksjon av MMP modeller

3.2.1 Database og PDB-filer

I MEROPS-databasen kan man finne PDB-databasen. PDB er en database som inneholder eksperimentelle 3D koordinater for proteiner. Disse er alle lagret under et ID- nummer. Koodinatene for ulike proteaser (=peptidaser), deriblant MMP, finnes her.

Modellene er lagret i et filformat med etternavn *.PDB. Disse filene kan leses av MIDAS og vises fram på dataskjermen som en tredimensjonal modell.

Den tredimensjonale strukturen til modellene har man kommet fram til ved røntgen-krystallografi. Dette er en prosess hvor man har en løsning med rent protein og lar proteinene krystallisere ut. Ved hjelp av røntgenstråling kan man få fram proteinets sekundær, tertiær og kvartærstruktur (”foldingen av proteinet”). Primærstrukturen (aminosyresekvensen) kan man finne fram til ved kjemiske analyser.

Fra MEROPS-databasen velger man familie M10 av metalloproteasene, subfamilie A.

I denne oppgaven har jeg valgt å ta for meg følgende 6 MMP:

- | | |
|-------------------------|--------------------|
| 1. MMP1 (collagenase 1) | MEROPS ID: M10.001 |
| 2. MMP2 (gelatinase A) | MEROPS ID: M10.003 |
| 3. MMP3 (stromelysin 1) | MEROPS ID: M10.005 |
| 4. MMP7 (matrilysin) | MEROPS ID: M10.008 |
| 5. MMP8 (collagenase 2) | MEROPS ID: M10.002 |
| 6. MMP13(collagenase 3) | MEROPS ID: M10.013 |

Ved å gå inn på en av disse vil et av valgene være ”struktur”. Her vil man komme inn på PDB- databasen og få opp en rekke forskjellige pdb-filer av proteasen. For alle MMP valgte man pdb-filer av katalytisk område som viser det frie enzymet uten ligand. For hver MMP ble pdb- filen med best oppløsning valgt (det betyr at de strukturelle detaljene i modellen er løst med større sikkerhet).

Følgende PDB-filer ble valgt som utgangspunkt for oppgaven:

1. MMP1: 1HFC.pdb
2. MMP2: 1CK7.pdb
3. MMP2 – katalytisk sete: 1QIB.pdb
4. MMP3: 1SLM.pdb
5. MMP7: 1MNQ.pdb
6. MMP8: 1MNC.pdb
7. MMP13: 456C.pdb

Programmet ClustalW ble brukt til å utføre et aminosyresekvens alignment av de katalytiske områdene til MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8 og MMP13.

3.2.2 Raffinering

De seks pdb-filene ble rensert for all tekst slik at man satt igjen med bare koordinatene. Deretter var tiden kommet for å kjøre gjennom Link, Edit og Parm (som nevnt under ”software”). Man inkluderte her Zn, Ca og vannmolekyler. Videre skulle man gjøre energiminimalisering i Sander, men her ble det problemer. Ved å inkludere vannmolekylene, oversteget man visse verdier slik at

Sander ikke ville fullføre minimaliseringen. Da man fjernet vannet, lot imidlertid minimaliseringen seg gjennomføre.

Alle de videre beregningene i oppgaven ble dermed utført uten at det er tatt hensyn til vannmolekylene i modellen. Man antar at dette vil spille en liten rolle siden beregningene baseres rundt det aktive setet hvor vannmolekylene ikke har noen signifikant betydning. Energiminimaliseringen ble utført over 2000 steg.

3.3 Måling av interatomære avstander

De interatomære avstandene mellom sink atomet og de koordinerende histidiner og glutamat er viktig for inhibitorer som binder i det aktive setet. Vi har derfor målt disse avstandene. Når det gjelder avstandene fra histidiner, tas det utgangspunkt i nitrogenet som ligger nærmest sink. For glutamat tas det utgangspunkt i det terminale oksygenet som er nærmest.

Bredden og dybden av det katalytiske setet i tillegg til hvilken aminosyre som finnes i bunnen er viktig for spesifisiteten. Kjennskap til bredden og dybden av det katalytiske setet er også viktig for utviklingen av potensielle hemmere.

Aminosyren som ligger i bunnen av det katalytiske setet er posisjonert 4 aminosyrer før histidinet som sekvensielt er nærmest N-terminalen av histidinene som koordinerer det katalytiske sink. Dybden definerer vi som avstanden mellom katalytisk sink og alfa-karbonet til aminosyren i bunnen.

Bredden definerer vi som avstanden mellom de to aminosyrene som ligger nærmest hverandre i toppen av lommen. Verdien fås ved å måle avstanden mellom alfa-karbonet til disse to aminosyrene

3.4 Docking av ligand inn i MMP3 (katalytisk område)

Som et eksempel på hvordan en mulig inhibitor kan virke, "docket" vi α -Bromo- β (5-imidazolyl)-propion syre inn i det katalytiske området på MMP3. Denne forbindelsen er en inhibitor av hestelever ADH (8).

Det katalytiske setet i hestelever ADH ligner mye på det katalytiske setet i MMP. Man kan dermed tenke seg at α -Bromo- β (5-imidazolyl)-propion syre kan la seg modifisere til å binde til det katalytiske setet i en MMP og dermed hemme denne.

4.0 Resultater

De interatomære avstandene i området omkring det katalytiske sink atomet i de undersøkte MMP`ene finnes i tabell 1 til 8.

Fig. 1 viser α -Bromo- β (5-imidazolyl)-propion syre.

Fig. 2 viser det katalytiske området til MMP3 med (α -Bromo- β (5-imidazolyl)-propion syre på det aktive setet.

Fig. 3 viser aminosyresekvens alignment av det katalytiske området til MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, og MMP13.

Tabell 1

Interatomære avstander mellom sentrale atomer i det aktive setet i MMP 3 etter energiminimalisering av krystallstrukturen av hele enzymet

| | | | |
|-------|---|---------|---------|
| ZN227 | - | HIS 177 | : 1,6 Å |
| | - | HIS 181 | : 1,6 Å |
| | - | HIS 187 | : 1,6 Å |
| | - | GLU 178 | : 3,8 Å |

| | | | |
|---------|---|---------|---------|
| HIS 177 | - | HIS 181 | : 2,8 Å |
| | - | HIS 187 | : 2,7 Å |

| | | | |
|---------|---|---------|---------|
| HIS 181 | - | HIS 187 | : 2,7 Å |
|---------|---|---------|---------|

| | | | |
|---------|---|---------|---------|
| GLU 178 | - | HIS 177 | : 3,7 Å |
| | - | HIS 181 | : 4,1 Å |
| | - | HIS 187 | : 5,2 Å |

DYBDE:

| | | | |
|--------|---|---------|----------|
| ZN 227 | - | LEU 173 | : 11,2 Å |
|--------|---|---------|----------|

BREDDE:

| | | | |
|---------|---|---------|----------|
| PRO 197 | - | VAL 139 | : 10,2 Å |
|---------|---|---------|----------|

Tabell 2

Interatomære avstander mellom sentrale atomer i det aktive setet i MMP 3 etter energiminimalisering av krystallstrukturen av det katalytiske området.

ZN 168 - HIS 118 : 1,7 Å
 - HIS 122 : 1,7 Å
 - HIS 128 : 1,8 Å
 - GLU 119 : 1,5 Å

HIS 118 - HIS 122 : 2,9 Å
 - HIS 128 : 2,7 Å

HIS 122 - HIS 128 : 2,7 Å

GLU 119 - HIS 118 : 2,6 Å
 - HIS 122 : 2,6 Å
 - HIS 128 : 2,8 Å

DYBDE:

ZN168 - LEU 114 : 10,4 Å

BREDDE:

PRO 138 - VAL 80 : 10,3 Å

Tabell 3

Interatomære avstander mellom sentrale atomer i det aktive setet i MMP 1 etter energiminimalisering av krystallstrukturen av det katalytiske området.

| | | | |
|---------|---|---------|----------|
| ZN 158 | - | HIS 112 | : 1,8 Å |
| | - | HIS 116 | : 1,7 Å |
| | - | HIS 122 | : 1,7 Å |
| | - | GLU 113 | : 1,5 Å |
| HIS 122 | - | HIS 116 | : 3,0 Å |
| | - | HIS 122 | : 2,7 Å |
| HIS 116 | - | HIS 122 | : 2,7 Å |
| GLU 113 | - | HIS 112 | : 2,6 Å |
| | - | HIS 116 | : 2,6 Å |
| | - | HIS 122 | : 2,8 Å |
| DYBDE: | | | |
| ZN 158 | - | ARG 108 | : 11,2 Å |
| BREDDE: | | | |
| PRO 132 | - | ASN 74 | : 10,1 Å |

Tabell 4

Interatomære avstander mellom sentrale atomer i det aktive setet i MMP 7 etter energiminimalisering av krystallstrukturen av det katalytiske området.

| | | | |
|--------|---|---------|---------|
| ZN 166 | - | HIS 119 | : 1,8 Å |
| | - | HIS 123 | : 1,8 Å |
| | - | HIS 129 | : 1,7 Å |
| | - | GLU 120 | : 1,5 Å |

| | | | |
|---------|---|---------|---------|
| HIS 116 | - | HIS 123 | : 3,1 Å |
| | - | HIS 129 | : 2,7 Å |

| | | | |
|---------|---|---------|---------|
| HIS 123 | - | HIS 129 | : 2,7 Å |
|---------|---|---------|---------|

| | | | |
|---------|---|---------|---------|
| GLU 120 | - | HIS 119 | : 2,6 Å |
| | - | HIS 123 | : 2,6 Å |
| | - | HIS 129 | : 2,9 Å |

DYBDE:

| | | | |
|--------|---|---------|----------|
| ZN 166 | - | TYR 115 | : 10,7 Å |
|--------|---|---------|----------|

BREDDE:

| | | | |
|---------|---|--------|----------|
| PRO 139 | - | THR 81 | : 10,5 Å |
|---------|---|--------|----------|

Tabell 5

Interatomære avstander mellom sentrale atomer i det aktive setet i MMP 8 etter energiminimalisering av krystallstrukturen av det katalytiske området.

| | | | |
|---------|---|---------|----------|
| ZN 159 | - | HIS 113 | : 1,7 Å |
| | - | HIS 117 | : 1,7 Å |
| | - | HIS 123 | : 1,8 Å |
| | - | GLU 114 | : 1,5 Å |
| HIS 113 | - | HIS 117 | : 2,8 Å |
| | - | HIS 123 | : 2,8 Å |
| HIS 117 | - | HIS 123 | : 2,7 Å |
| GLU 114 | - | HIS 113 | : 2,6 Å |
| | - | HIS 117 | : 2,6 Å |
| | - | HIS 123 | : 2,8 Å |
| DYBDE: | | | |
| ZN 159 | - | LEU 109 | : 10,5 Å |
| BREDDE: | | | |
| PRO 133 | - | ILE 75 | : 10,0 Å |

Tabell 6

Interatomære avstander mellom sentrale atomer i det aktive setet i MMP 13 etter energiminimalisering av krystallstrukturen det katalytiske området.

| | | | |
|--------|---|---------|---------|
| ZN 161 | - | HIS 113 | : 1,7 Å |
| | - | HIS 117 | : 1,8 Å |
| | - | HIS 123 | : 1,7 Å |
| | - | GLU 114 | : 1,5 Å |

| | | | |
|---------|---|---------|---------|
| HIS 113 | - | HIS 117 | : 2,8 Å |
| | - | HIS 123 | : 2,8 Å |

| | | | |
|---------|---|---------|---------|
| HIS 117 | - | HIS 123 | : 2,7 Å |
|---------|---|---------|---------|

| | | | |
|---------|---|---------|---------|
| GLU 114 | - | HIS 113 | : 2,6 Å |
| | - | HIS 117 | : 2,6 Å |
| | - | HIS 123 | : 2,8 Å |

DYBDE:

| | | | |
|--------|---|---------|----------|
| ZN 161 | - | LEU 109 | : 10,5 Å |
|--------|---|---------|----------|

BREDDE:

| | | | |
|---------|---|--------|----------|
| PRO 133 | - | LEU 75 | : 10,7 Å |
|---------|---|--------|----------|

Tabell 7

Interatomære avstander mellom sentrale atomer i det aktive setet i MMP 2 etter energiminimalisering av krystallstrukturen av hele enzymet

| | | | |
|---------|---|---------|----------|
| ZN 631 | - | HIS 373 | : 1,6 Å |
| | - | HIS 377 | : 1,6 Å |
| | - | HIS 383 | : 1,6 Å |
| | - | GLU 374 | : 3,6 Å |
| | - | GLU 382 | : 5,2 Å |
| | | | |
| HIS 373 | - | HIS 377 | : 2,8 Å |
| | - | HIS 383 | : 2,7 Å |
| | | | |
| HIS 377 | - | HIS 383 | : 2,7 Å |
| | | | |
| GLU 374 | - | HIS 373 | : 3,5 Å |
| | - | HIS 377 | : 3,9 Å |
| | - | HIS 383 | : 5,0 Å |
| | - | GLU 382 | : 8,3 Å |
| | | | |
| GLU 382 | - | HIS 373 | : 6,5 Å |
| | - | HIS 377 | : 4,5 Å |
| | - | HIS 383 | : 4,6 Å |
| | | | |
| DYBDE: | | | |
| ZN 631 | - | LEU 369 | : 11,2 Å |
| | | | |
| BREDDE: | | | |
| PRO 393 | - | LEU 160 | : 10,5 Å |

Tabell 8

Interatomære avstander mellom sentrale atomer i det aktive setet i MMP 2 etter energiminimalisering av krystallstrukturen av det katalytiske området.

| | | | |
|---------|---|---------|----------|
| ZN 161 | - | HIS 114 | : 1,8 Å |
| | - | HIS 118 | : 1,7 Å |
| | - | HIS 124 | : 1,7 Å |
| | - | GLU 115 | : 1,5 Å |
| | - | GLU 123 | : 9,5 Å |
| HIS 114 | - | HIS 118 | : 2,8 Å |
| | - | HIS 124 | : 2,7 Å |
| HIS 118 | - | HIS 124 | : 2,7 Å |
| GLU 115 | - | HIS 114 | : 2,6 Å |
| | - | HIS 118 | : 2,6 Å |
| | - | HIS 124 | : 2,8 Å |
| | - | GLU 123 | : 10,6 Å |
| GLU 123 | - | HIS 114 | : 9,8 Å |
| | - | HIS 118 | : 10,6 Å |
| | - | HIS 124 | : 9,5 Å |
| DYBDE: | | | |
| ZN 161 | - | LEU 110 | : 10,5 Å |
| BREDDE: | | | |
| PRO 134 | - | LEU 76 | : 10,9 Å |

5.0 Diskusjon

Fra tabellene kan vi se at de interatomære avstandene i det aktive setet er nokså like hos alle MMP`ene. Avstandene fra det katalytiske sink til de tre histidinene ligger mellom 1,6 og 1,8 Å. Avstandene mellom de tre histidinene er relativt lik for alle MMP`ene og varierer mellom 2,7 og 3,0 Å. Dybde og bredde er også vel bevart gjennom alle MMP`ene. Dypest er MMP3 (hele enzymet) med 11,2 Å. Grunnet er MMP3 (katalytisk område) med 10,4 Å. Bredest er MMP2 (katalytisk område) med 10,9 Å. Smalest er MMP8 med 10,0 Å. Det vil derfor være vanskelig å utvikle subtype- spesifikke småmolekyl inhibitorer som binder til sink og koordinerende aminosyrer. Skal man finne subtype spesifikke inhibitorer, må man derfor inkludere sekundære bindings seter i MMP`ene.

Avstandene fra katalytisk sink til glutamat er på 1,5 Å hos alle unntatt MMP3 (hele enzymet) og MMP2 (hele enzymet) hvor avstanden er henholdsvis 3,8 og 3,6 Å. Mellom de tre histidinene og glutamatet som er felles for alle MMP`ene, er avstanden mellom 2,6 og 2,8 Å. Modellene for hele MMP2 og MMP3 skiller seg her ut ved at disse avstandene er noe større og ligger mellom 3,5 og 5,2 Å. Det tyder derfor på at områder utenfor det katalytiske setet påvirker den tredimensjonale strukturen i det katalytiske setet, noe det må tas hensyn til ved design av inhibitorer.

MMP2 har i tillegg en glutamat på oversiden av sink som kan være viktig for utviklingen av hemmere. Avstanden fra sink til dette glutamatet er 5,2 Å for hele enzymet og 9,5 Å for det katalytiske området.

Som tidligere nevnt ligner det katalytiske setet i MMP mye på det tilsvarende setet i hestelever ADH. Videre er α -Bromo- β (5-imidazolyl)-propion syre en hemmer av hestelever ADH.

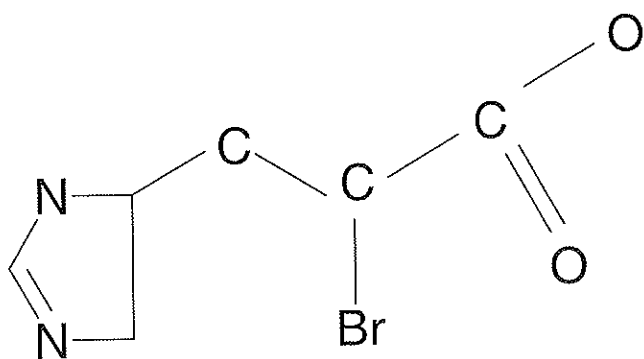


FIG. 1 (α -Bromo- β (5-imidazolyl)-propion syre)

I hestelever ADH koordineres sink av to histidiner og et cystein. Et av nitrogenatomene i α -Bromo- β (5-imidazolyl)-propion syre danner en ikke-kovalent binding med sinkatomet.

Den negativt ladede karboksyl-gruppen binder videre til et positivt ladet arginin i hestelever ADH.

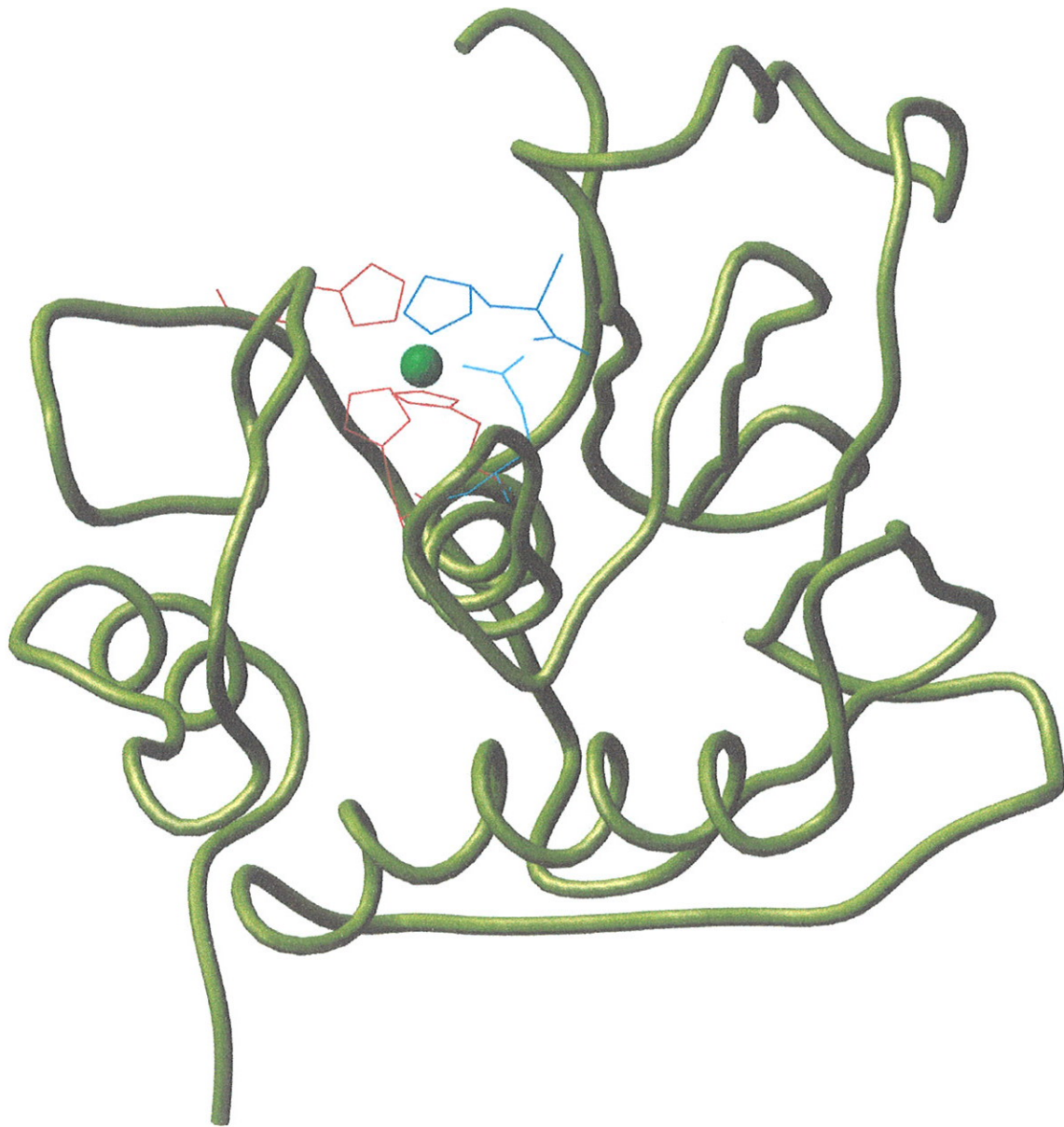


FIG. 2 Viser bilde av det katalytiske område i MMP3 med foreslått plassering av α -Bromo- β (5-imidazolyl)-propion syre(magenta) . Tre histidiner(røde) koordinerer sink (grønn) på samme måte som de to histidinene og cysteinet i hestelever ADH. I tillegg sees glutamat (blå) som også koordinerer sink.

I stedet for et positivt ladet arginin, har MMP3 (og de andre MMP`ene) et glutamat med negativ ladning som kan spille samme rolle som argininet i hestelever ADH.

For at α -Bromo- β (5-imidazolyl)-propion syre skal binde bedre til MMP3, kan man tenke seg å bytte ut den negativt ladede karboksylgruppen med en positivt ladet gruppe som vil binde ikke-kovalent til glutamat.

Siden alle MMP`ene har de tre histidinene og det ene glutamatet, forstår vi at en slik modifisert α -Bromo- β (5-imidazolyl)-propion syre ikke vil kunne bli en selektiv MMPx hemmer.

Ved å lete etter forskjeller i aminosyresekvensen rundt det katalytiske området, kan man prøve å finne en eller flere aminosyrer som bare en MMP har og som i tillegg befinner seg i en gunstig posisjon for å kunne binde til inhibitoren. Som tidligere nevnt har MMP2 en ekstra glutamat som kan bidra til å koordinere sink. Ved å addere en sekundær positivt lada gruppe til liganden, kan man gjøre at liganden også når denne.

```

mmp1      -VLTEGNPRWEQTHLTYRIENYTPDLPRADVDAIEKAFQLWSNVTPPLTFKVSSEGQADI
mmp8      --LTPGGPKWERTNLTYRIRNYTPQLSEAEVERAIKDAFELWSVASPLIFGTISQGEADI
mmp2      ----RKPKWDKNQITYRIIGYTPDLLPETVDDAFARAFQVWSDVTPLRFSRIHDGEADI
mmp13     YNVFPRTLKWSKMNLTYRIVNYTPDMTHSEVEKAFKKAFFVWSDVTPLNFTRLHDGIADI
mmp3      -RTFPGI PKWRKTHLTYRIVNYTPDLLPKDAVDSAVEKALKVWEEVTPLTFSRLYEGEADI
mmp7      YSLFPNSPKWTSKVVYTRIVSYTRDLPHITVDRLVSKALNMWGKEIPLHFRKVVWGTADI
          :*      :**** .* : : * : . * : : * ** * : * ***

mmp1      MISFVRGDHRDNSPFDGPGGNLAHAFQPGPGIGGDAHFEDEDERWTN-NFREYNLHRVAAH
mmp8      NIAFYQRDHGDGSPFDGPNGLAHAFQPGQGIGGDAHFDAEETWTN-TSANYNLFLVAAH
mmp2      MINFGRWEHGDGYPFDDGKLLAHAFAPGTGVGGDSHFDDDELWSLKGKGVGYSFLFLVAAH
mmp13     MISFGIKEHGDYFPFDGPGSLLAHAFPPGPNYGGDAHFDDEETWTS-SSKGYNLFLVAAH
mmp3      MISFAVREHGDYFPFDGPGNVLAHAYAPGPGINGDAHFDDEEQWTK-DTTGTNLFLVAAH
mmp7      MIGFARGAHGDSYFPFDGPGNLAHAFAPGTGLGGDAHFEDEDERWTDGSSLINFLYAATH
          * *      * * **** .. ***** : * . .**:* ** : * * : . : .:*:*

mmp1      ELGHSGLSLSHSTDIGALMYPSTYTF---SGDVQLAQDDIDGIQAIYGRSQNPFVQP
mmp8      EFGHSGLSLAHSSDPGALMYPNYAFRE-TSNYSLPQDDIDGIQAIYGL-----
mmp2      EFGHAMGLEHSQDPGALMAPIYTYT---KNFRLSQDDIKGIQELYGASP-----
mmp13     EFGHSGLDLHSDKDPGALMFPYTYTG-KSHFMLPDDDVQGIQSLYGPGE----
mmp3      EIGHSLGLFHSANTEALMYPYHSLTDLTRFRLSQDDINGIQSLYGPFP-----
mmp7      ELGHSGLGMGHSNDPNAVMPYTYGNGD-PQNFKLSQDDIKGIQKLYGKRNS---
          *.*.*.* : * * : *.* * * * * . : *.*.*.* : **

```

Fig. 3. Aminosyresekvens alignment av de katalytiske områdene til MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, og MMP13.

Residuen i MMP`ene som tilsvarer 80 til 86 og 123 til 130 i MMP3 ligger rundt det katalytiske setet. Finner man forskjeller her, kan det tenkes at disse kan brukes for å syntetisere en subtype spesifikk inhibitor.

Residu 129 er interessant i så måte, hvor MMP`ene har følgende residuer:

1. Glutamatet i MMP2 og aspartatet i MMP13 er negative med forskjellig lengde.
2. MMP1 har en OH – gruppe i serin
3. MMP3 har en aromatisk aminosyre (phenylalanin)
4. MMP7 og MMP8 har en svært liten aminosyre (henholdsvis glysin og alanin)

Liganden kan derfor modifiseres med funksjonelle grupper for å nå residuet tilsvarende posisjon 129 i det katalytiske området til MMP3.

1. Addere til liganden en positiv gruppe. Vil da kunne binde sterkest til MMP2 og MMP13.
2. Addere aromatisk gruppe til liganden. Vil da binde sterkest til MMP3.
3. Addere stor hydrofob gruppe til liganden. Vil da sannsynligvis passe best i MMP7 og MMP8.
4. Addere en gruppe med OH til liganden. Vil da kunne binde MMP1, MMP2 og MMP13.

6.0 Konklusjon

Våre studier tyder på at det vil være vanskelig å foreslå subtype spesifikke inhibitorer som bare binder til sink og koordinerende aminosyrer i det aktive setet. Skal man kunne foreslå molekyler som vil kunne være subtype spesifikke inhibitorer, må sekundære bindingsseter i enzymet involveres. Aminosyren tilsvarende posisjon 129 i MMP3 (phe) kan være en gunstig kandidat i så måte.

7.0 Referanser

1. J.M. Ray, W.G. Stetler-Stevenson. The role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur Respir J*, 1994, 7: 2062-2072.
2. Jones J.L., Walker R.A. Control of matrix metalloproteinase activity in cancer. *J. Pathology*, 1997, 183: 377-379.
3. G. E. Terp, I. T. Christensen, F. S. Jørgensen. Structural Differences of Matrix Metalloproteinases. Homology Medeling and Energy Minimization of Enzyme-Substrate Complexes. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 2000, Vol. 17, Issue 6: 933-945.
4. A. Leach. Molecular modeling. Principles and applications. *Addison Wesley Lonyman Limited*, 1996.
5. W. D. Cornell, P. Creplak, C. I. Bayly, I. R. Gould, K. M. Merz Jr., D. M. Ferguson, D. C. Spellmeyer, T. Fox, J. W. Caldwell, P. A. Kollmann. A second generation force field for the simulations of proteins, nucleic acids, and organic molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117: 5179-5197.
6. T. E. Ferrin, C. C. Huang, L. E. Jarus, R. Longride. The MIDAS display system. *J. Mol. Graphics*, 1988, 6: 13-27.
7. Julie D. Thompson, F. Plewniak, Olivier Poch. A comprehensive comparison of multiple sequence alignment programs. *Nucleic Acids Research*, 1999, 27, 13: 2682-2690.
8. Knut H. Dahl, John S. McKinley-McKee. Affinity Labeling of Alcohol Dehydrogenases. *Eur. J. Biochem.* 81: 223-235 (1977).