

МЕХАНИСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПО МОНОАМИНОКСИДАЗЕ: ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ MAO A И MAO B *IN SITU*.

Р. РАМСЭЙ

Факультет Биологических и Медицинских Наук, Университет Сент-Эндрюса, Шотландия

School of Biological and Medical Sciences, University of St Andrews,
Irvine Building, North Street, St. Andrews, Fife, KY16 9AL, Scotland, U.K

MAO A и MAO B участвуют в окислении первичных, вторичных и третичных аминов. Механизм реакции, катализируемой этими ферментами, сходен, однако, они различаются по субстратной и ингибиторной специфичности, а также по кинетическим характеристикам. Исследования, проведенные на очищенных ферментах, показали, что моноаминоксидазы - необычные ферменты, поскольку: 1) Некоторые субстраты ускоряют окислительную полуреакцию (во много раз сильнее в случае MAO A по сравнению с MAO B); 2) связывание субстратов вызывает огромный положительный сдвиг - в редокс потенциале флавина. Молекулярная основа этих свойств и структура активного центра, столь необходимые для рационального конструирования лекарств, до сих пор неизвестны.

В настоящем обзоре представлены данные о биохимии MAO и некоторые соображения о том, что означают кинетические и термодинамические свойства изолированных ферментов для каталитического выражения аминоксидазных активностей *in vivo*. Особенности физиологической роли MAO A и MAO B, очевидно, обусловлены тем, что эти ферменты экспрессируются в разном соотношении и в различных типах клеток. Их экспрессия варьирует также на разных этапах развития и старения организма. Методы молекулярной локализации могут использоваться для измерения уровней MAO в специфических типах клеток, а не в области смешанных клеток. Когда эта информация будет сопоставлена с кинетическими константами, тогда станет возможным создание количественных моделей, предсказывающих метаболизм данного амина в определенной клетке. Это должно помочь понять роль аминов в развитии организма, а также роль эндогенных ингибиторов в изменении уровня биологически активных аминов.

Принятые сокращения: MAO (без уточнения A или B) обозначает обе формы моноаминоксидазы; MPTP) 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин; MPP⁺) ион 1-метил-4-фенилпиридиния.

Ключевые слова: моноаминоксидаза, кинетические и термодинамические свойства, физиологическая регуляция

ВВЕДЕНИЕ. MAO A и MAO B окисляют первичные, вторичные и третичные амины. Они различаются по субстратной и ингибиторной специфичности [1,2]. Исследования на очищенных ферментах показали, что моноаминоксидазы - необычные ферменты, потому, что: 1) некоторые субстраты ускоряют окислительную полуреакцию (во много раз сильнее в случае MAO A чем MAO B) [3-5]; 2) связывание субстратов вызывает положительный сдвиг в редокс - потенциале флавина [6]; 3) ЭПР-сигналы для аминоксина FAD меньше, чем ожидалось [7]. MAO A и B - разные белки, кодируемые различными генами [8]. Оба фермента являются димерами с молекулярной массой около 120 кДа и их аминокислотная последовательность характеризуется 73% гомологии [2]. Они экспрессируются в разном соотношении, в разных типах клеток и их экспрессия варьирует

во время развития и старения организма [2]. Перечисленные различия подразумевают особую физиологическую роль каждого из ферментов.

В настоящем обзоре представлены данные о биохимии MAO и некоторые соображения о том, что означают кинетические и термодинамические параметры изолированных ферментов для каталитического выражения их аминоксидазной активности *in vivo*. Последние достижения в клеточной биологии и молекулярной генетике MAO A и B, исследования уровня аминов животных, у которых активность MAO модифицировали делецией, избыточной экспрессией или ингибированием позволяет сблизить связующие соображения с действительностью.

Исследования *in vitro*. Химический механизм. Интрига термодинамики катализируемого MAO окисления аминов заключается в том, что амины с редокс потенциалом около +1В окисляются кислородом с образованием перекиси водорода (редокс потенциал +0,3В) через редокс пару FAD/FADH (потенциал которой обычно около -0,2В). Как этот фермент осуществляет протекание такой реакции непонятно. В химическом механизме все еще остается спорным вопрос происходит ли катализируемое MAO окислительное дезаминирование посредством радикального механизма, переноса гидрида или окисления промежуточного карбаниона.

В наиболее хорошо проверенной гипотезе [9] окисления амина, приведенной на рисунке 1, перенос одного электрона от амина на фермент (вероятно, на флаavin) сопровождается разрывом α -углерод-водородной связи и образованием аминного радикала. Радикал субстрата или передает второй электрон на флавин или соединяется с неизвестным радикалом активного центра, который образует ковалентный аддукт, распадающийся до имина. Все, что демонстрируют кинетические изотопные исследования, так это то, что самым медленным шагом является отщепление водорода. Однако, флавосемихинон так и не был обнаружен в каталитическом цикле [10-12], поэтому споры о механизме продолжаются.

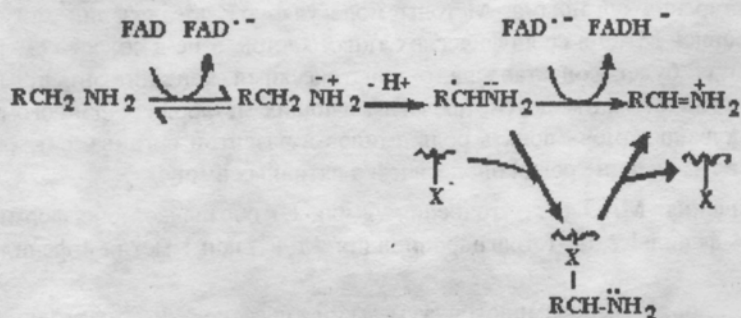


Рис. 1. Предполагаемый механизм окисления аминов при участии MAO

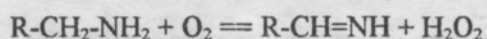
Показана наиболее широко тестируемая гипотеза (Silverman [9]) для окисления амина до имина. Хотя семихиноновый интермедиат никогда не был обнаружен в ходе катализа, считают, что ковалентно связанный FAD восстанавливается в два одноэлектронных этапа.

Указан возможный путь, вовлекающий белковый радикал и временный ковалентный интермедиат между MAO и амином. Адаптировано из [9].

Исследования стационарной кинетики. Каждый исследователь интересовавшийся MAO, измерял активность MAO каким-нибудь способом. Прежде чем принять данные любого эксперимента по стационарной кинетике за достоверные необходимо проверить следующее. Во-первых, прежде чем было установлено, что MAO A и MAO B являются различными ферментами, во многих работах не уточнялось, какая из форм исследовалась.

Для изучения МАО в митохондриальных мембранах или гомогенатах используемая ткань должна либо экспрессировать одну из форм, либо одну из форм (в случае экспрессии МАО А и МАО В) необходимо избирательно ингибировать перед определением другой. Тромбоциты человека или печень быка традиционно используются для исследования МАО В, а плацента человека содержит преимущественно МАО А (см. обзоры [1, 2]). Для специфического ингибирования необходимо осторожно оттитровать МАО А или МАО В, избегая торможения другого фермента. Концентрация хлоргиллина, необходимая для 50% торможения МАО А в 1000 раз меньше, чем для 50% торможения МАО В, однако интервал концентраций, при которых происходит полное ингибирование МАО А и еще не начинается торможение МАО В существенно уже [13, 14].

Во вторых, нужно помнить, что МАО является БИ-субстратным ферментом. Уравнение реакции для первичных аминов выглядит следующим образом:



Для получения истинных кинетических констант нужно варьировать оба субстрата. За исключением нескольких работ (например, [14-16]) большинство исследователей для удобства используют постоянную концентрацию кислорода, которая имеется в насыщенном воздухе буфере. Однако, необходимо помнить, что концентрация кислорода в растворе варьирует в зависимости от температуры (0,25 мМ при 25°C, 0,20 мМ при 37°C), так что кинетические константы, полученные при этих температурах будут различаться. Правда, большинство результатов исследований согласуются друг с другом. Это связано с тем, что восстановление фермента амином является главным фактором в определении стационарной скорости оборота (см. ниже). Кроме того, МАО А имеет низкую K_m для кислорода (6 мМ для фермента плаценты, 60 мМ для клонированного фермента печени человека [17]). Поэтому в аэрированном буфере концентрация кислорода в 4 раза превышает значение K_m . Иная ситуация с МАО В: величина K_m для кислорода у фермента печени быка 0,28 мМ [18], поэтому при определении активности МАО В в насыщенном воздухе буфере (0,20 мМ при 37°C) концентрация кислорода НИЖЕ значений K_m . При таком определении будет измеряться только половина истинной величины V_{max} , а кажущиеся кинетические константы будут различаться при разных температурах. Величина вариации кажущихся кинетических констант с изменением концентрации кислорода зависит от соотношения скоростей восстановления флавина амином и его последующего реокисления. Это иллюстрируют данные таблицы 2. При использовании серотонина в качестве субстрата МАО В значения K_m и K_d совпадают, потому что скорость восстановления флавина в фермент-субстратном комплексе (k_3) во много раз медленнее чем скорость окислительной полуреакции (k_{app}). В случае фенилэтиламина величина K_m в 1000 раз ниже значения K_d потому что окислительная полуреакция происходит медленнее. Если влияние концентрации кислорода на кинетические константы неизвестно, данные не могут быть экстраполированы к более низким концентрациям кислорода, найденным во многих тканях.

В третьих, и прежде всего, процедура определения ферментативной активности должна быть тщательно обоснована. Сложность и ошибки в измерении активности МАО подробно описаны, но они зачастую игнорируются. Недавний обзор и сопоставление результатов измерений с помощью радиохимического и полярографического методов описывают необходимые детали правильного определения активности МАО [19-20]. Исследования по связыванию, определяющие количество белка МАО, также могут быть проблематичными [21].

Что ясно из исследований стационарной кинетики, так это то, что МАО А и В с разной степенью эффективности могут метаболизировать амины-нейромедиаторы [21-22]. Из

данных таблицы 1 легко видеть, почему метаболизм серотонина мог быть приписан только MAO A. Что менее очевидно, так это почему ингибиторы MAO B могут предохранять от токсичности MPTP *in vivo* [23, 24]. И MAO A, и MAO B очень хорошо окисляют MPTP *in vitro* (Таблица 2) [3, 25]. Объяснение лежит в локализации этих активностей. Преобладание MAO B в астроцитах делает этот фермент основным катализатором, продуцирующим нейротоксин MPP⁺, который аккумулируется дофаминергической системой обратного захвата, приводя к внутриклеточному накоплению этого токсина, ингибированию NADH-дегидрогеназы и гибели клеток. Различия между кинетическими данными *in vitro* и наблюдениями *in vivo* подчеркивают важность знания точной локализации этих двух ферментов в интересующей биологической системе.

Table 1 Окисление аминов MAO A и MAO B

Субстрат	Каталитическая константа (V/K_m)	
	MAO A	MAO B
Серотонин	540	7
тирамин	309	113
β -Фенилэтиламин (PEA)	46	4350
Дефамин	231	232
Норадреналин	232	143

Максимальные скорости реакции в азириванном буфере, измеренные отдельно для MAO A и MAO B, выражены в виде % общей скорости окисления: K_m , mM. Расчитано на основании результатов [22].

Кинетические исследования использовали для выяснения субстратной и ингибиторной специфичности этих двух ферментов. Благодаря структурно-функциональным исследованиям были развиты представления об очертаниях и размерах активных центров MAO A и B. Кинетические параметры окисления нейротоксина MPTP и его аналогов [25] привели к первой рудиментарной модели двух ферментов [26]. Субстратный участок имеет аминсвязывающий карман около 8,5 Å в длину и 2,5 Å в ширину (что было подсчитано на основании полуэмпирических расчетов молекулярных орбиталей MPTP и его аналогов), схожий для MAO A и MAO B и объемную область для заместителей с гидрофобными карманами. Эта часть больше у MAO B и значительно отличается по форме, свидетельствуя о том, что размер и топография активного центра определяют субстратную специфичность.

Другие кинетические исследования. Кинетически реакция катализируемая MAO A и MAO B протекает по одному механизму, однако существуют большие различия во влиянии субстратов на кинетические параметры полуреакций [3-5]. Механизм (Рис.2) включает восстановление флавина амином. Дальнейшее реокисление ковалентно связанного кофактора FAD происходит либо прямым окислением свободного фермента, либо - окислением фермент-субстратного комплекса [4-5]. Комплекс фермент-продукт (или во всяком случае четвертичный аминный продукт MPP⁺) не реокисляется. Поток через каждый из этих путей будет зависеть от относительных констант скорости и концентраций субстрата промежуточных форм фермента. Схема на рис. 2 показывает, что связывание амина со ферментом влияет на реакцию восстановленного флавина с кислородом. Несвязанный с лигандом фермент окисляется медленно, в то время как восстановленный фермент с все еще связанным с ним субстратом окисляется во много раз быстрее. Стимуляция реокисления зависит от использованного субстрата, варьируя для MAO A от пятикратной с серотином до сто двадцатикратной с кинуратином [3]. Этот эффект менее выражен для MAO B:

β -фенилэтиламин вообще не стимулирует реокисления, а бензиламин увеличивает этот процесс в 8 раз [3]. Поскольку флавин-содержащие пептиды MAO A и B идентичны эти кинетические различия, очевидно, обусловлены особенностями субстратных участков.

Таблица 2 : Кинетические параметры MAO A и MAO B

	Стационарное состояние		Восстановление		Окисление	
	k_{cat}	KM	k_3	KD	k_{app}	k_{ox}
substrate	(s ⁻¹)	(mM)	(s ⁻¹)	(mM)	(s ⁻¹)	(mM ⁻¹ s ⁻¹)
MAO A						
кинурамин	2.65	0.15	3.1	0.58	120	508
бензиламин	0.02	0.90	0.06	0.23	23	106
PEA	0.75	0.50	1.10	0.90	12	48
серотонин	2.80	0.40	2.1	0.40	5.7	24
MPTP	0.20	0.09	0.16	0.04	40	166
MAO B						
кинурамин	2.75	0.084	13.6	1.11	2.17	2.89
бензиламин	10.0	0.36	10.9	0.14	7.6	29.4
PEA	3.62	0.067	572	4.5	1.8	5.35
серотонин	0.077	0.28	0.097	0.24	1.7	4.12
MPTP	3.30	0.32	3.7	0.04	6.0	23.3

Стационарные параметры измеряли при 0,238 mM O₂. Все измерения проведены при 30°C.

Восстановительную полуреакцию исследовали в анаэробных условиях; k_3 - константа скорости восстановления флавина в фермент-субстратном комплексе. Для изучения окислительной полуреакции варьировали концентрацию кислорода; k_{ox} - константа скорости второго порядка для окисления флавина кислородом; k_{app} при 0,238 mM O₂. Данные взяты из [5].

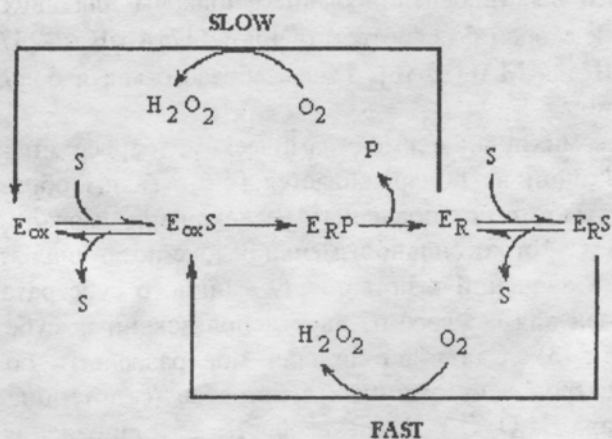


Рис. 2. Кинетический механизм MAO.

Схема альтернативного пути предложена на основе данных по стационарному и предстационарному состоянию [3,4]. Субстрат связывается с окисленным ферментом (E_{ox}), что приводит к восстановлению фермента. Восстановленный фермент (E_R) медленно реагирует с кислородом (1 s⁻¹ при насыщении воздухом), однако, восстановленный фермент-субстратный комплекс (E_RS) реокисляется намного быстрее.

Аминокислотные остатки активного центра. Несмотря на многочисленные усилия локализация субстратного участка все еще неизвестна. Механизм-активируемые ингибиторы связываются либо с флавином, либо с цистеином активного центра. Участок присоединения флавина у МАО А и МАО В идентичен [27]. Метки, присоединенные к цистеину, мигрируют на развернутом или подвернутом перевариванию белке, поэтому пометить пептиды активного центра пока не удалось. Эксперименты по химической модификации выявили существенную для катализа роль остатка гистидина. Убедительные данные свидетельствуют о присутствии двух остатков цистеина в активном центре МАО [29]. Ингибирование МАО сульфгидрильными реагентами обнаруженное еще в 1945, теперь хорошо обосновано, однако роль существенных остатков цистеина [28-34] в механизме катализа все еще не установлена.

Молекулярно-биологические подходы идентифицировали цистеин А406/В397 в качестве места прикрепления флавина. Кофактор FAD связывается также динуклеотидсвязывающей областью около N-конца и в этом существенная роль принадлежит остаткам глутамата В34 и тирозина В44 [35,36]. Точка ковалентного присоединения флавина окружена областью высококонсервативных остатков (389-460 у МАО А). Цистеин А374/В365 существенен для каталитических активностей. Что же касается второго цистеина, то данные химической модификации не столь очевидны [34]. Вероятным кандидатом на эту роль является цистеин В389. Активность мутанта, у которого вместо цистеина В389 находится серин, составляет 70%, однако, если этот цистеин мутировать на аланин, фермент теряет свою активность. Существенный остаток гистидина был идентифицирован для МАО В в положении В382, а мутация треонина В158 на аланин также приводила к потере активности [28]. Остатки, определяющие субстратную и ингибиторную специфичность, могут быть в консервативной области 187-230 МАО А, однако более вероятно, что это обеспечивают несколько областей, так как у химерных молекул не происходит превращения специфичности одного фермента к другому [37, 38].

Редокс-потенциал. Для изучения молекулярной основы стимуляции субстратами окислительной полуреакции были исследованы эффекты связывания субстрата на термодинамические свойства простетической группы флавина. Редокс-потенциалы для половинного и полного восстановления были одинаковы для двух форм фермента. Они составили для первой и второй фаз соответственно -147 ± 4 мВ и -237 ± 3 мВ для МАО А и -155 ± 4 мВ и -249 ± 3 мВ для МАО В [6]. Таким образом, как и большинство оксидаз МАО стабилизирует семихинон.

Стабилизация семихинона термодинамическими барьерами исчезает в присутствии субстрата, когда семихинон не обнаруживается [4-6]. Таким образом, только полностью окисленная - полностью восстановленная редокс-пара может быть исследована в присутствии субстрата. Субстрат сильно изменял редокс-потенциал этой пары, сдвигая его в область положительных значений к потенциалу аминного субстрата почти на 500 мВ [6]. Этот сдвиг был различен для каждого из двух использованных субстратов, он отличался у МАО А и В (Таблица 3). Сдвиг потенциала мог разрешить более термодинамически выгодный перенос электронов от аминных субстратов (с потенциалами +0,5 и +1 В) на кислород (+0,3 В, пара $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_2$). Если скорость восстановления флавина субстратом коррелирует с редокс-потенциалами, т.е. увеличение потенциала флавина облегчает перенос электронов от амина к флавину это наблюдение могло бы помочь объяснить в течение многих лет удивлявший исследователей перенос электронов от аминов, имеющих высокий потенциал, к флавину, потенциал которого много ниже.

Таблица 3. Редокс - потенциалы (2-электронные) для MAO A и MAO B в присутствии субстратов.

Субстрат	Редокс - потенциал (mV \pm s.d.)	
	MAO A	MAO B
—	-210	-221
5-Гидрокситриптамиин		+194 \pm 9
α -Нетилбензоламин	-116 \pm 4	+281 \pm 12
Сензоламин	+263 \pm 15	

Редокс - потенциалы для MAO в присутствии субстрата определяли по сравнению с краской [6]. Пару ксантин/урат (-350 mV at pH 7) использовали для восстановления ксантиноксидазы, которая быстро уравнивается с метилвиологеном, который в свою очередь быстро реагирует с остальными красками или флавопротеинами. Для определения редокс - потенциала в присутствии субстрата, субстрат (в концентрации 20 K_m) использовали в качестве восстановителя. Молярные фракции каждого вида определяли нелинейным регрессионным анализом спектральных изменений. Представлены средние величины \pm стандартное отклонение для 3 определений.

Значение для катализа MAO *in vivo*. Распределение. Как уже отмечалось выше, значение распределения MAO A и MAO B в интересующей системе особенно важно для предсказания влияния MAO или их ингибиторов на метаболизм аминов. Современные молекулярные методы могут сейчас обеспечить такой информацией во все более специфических условиях. Традиционные методы фракционирования и определения активности показали повсеместное распределение MAO, что согласуется с их ролью в защите от биогенных аминов (см. обзор [2]). Необратимые ингибиторы хлоргиллин (специфичный в отношении MAO A) и депренил (специфичный в отношении MAO B) являются полезными инструментами для изучения локализации и в настоящее время могут быть использованы для исследований *in vivo* с помощью позитронно-эмиссионной томографии [41]. Недавно таким образом было обнаружено, что в мозге курильщиков активность MAO снижена [42].

Авторадиография с обратимым или прочносвязанным ингибиторами и иммунохимические методы были использованы для описания микрораспределения MAO в отдельных областях мозга и клеток [43-45]. MAO B присутствует по всему мозгу человека с наивысшим уровнем в эндиме желудочков и некоторых нейронах гипоталамуса. MAO A имеет более четкую локализацию особенно в норадренергических нейронах, таких как в *locus coeruleus*. Серотонинергические нейроны содержат MAO B [43]. Гистохимическое изучение с помощью гибридизации *in situ*, проведенное для локализации участков активного центра каждого фермента, предполагает более обширный оборот MAO A и более ограниченный но интенсивный оборот MAO B [46, 47].

Такие исследования говорят нам, где локализована каждая MAO и в каких количествах. Используя кинетические константы, определенные для очищенного фермента, количество MAO может быть переведено в скорость и специфичность аминоксидазной активности, имеющейся в отдельном типе клетки. Можно построить модели того, как каждая конкретная область обращается в различными аминами, что может в конечном итоге дать некоторые идеи о локальных особенностях окисления аминов. Основываясь только на кинетических константах можно ожидать, что MAO A будет преобладать в метаболизме большинства аминов при низких концентрациях кислорода. Даже такой субстрат MAO B как β -фенилэтиламин может метаболизироваться MAO A [3]. При высоких концентрациях кислорода преобладающую роль в метаболизме смешанных субстратов, таких как дофамин, будет играть MAO B. Однако благодаря ускорению при высоких концентрациях субстрата

окислительной полуреакции, катализируемой МАО А, "прилив" амина увеличит поток через МАО А больше чем через МАО В. Одним словом, МАО А компетентна реагировать на тип и уровень имеющегося амина, в то время как активность МАО В больше варьирует с изменением концентрации кислорода [6]. Этот тезис предсказывает, что в условиях гипоксии клетки, содержащие МАО В, будут менее защитимы от биогенных аминов либо будут создавать превышающие норму концентрации присутствующих аминных субстратов, в то время как клетки, содержащие МАО А будут менее уязвимы. Возможно, это дает рациональное объяснение присутствия МАО А с очень низкой K_m для O_2 в плаценте человека для того, чтобы обеспечить защиту от аминов даже когда обеспечение кислородом снижается.

Регуляция МАО. Физиологическая регуляция. Многочисленные факторы, включая возраст, пол, и гормоны влияют на уровни МАО А и МАО В (краткий обзор можно найти в [2]). Наиболее известно увеличение активности МАО В с возрастом. При рождении активность МАО В низка, но она увеличивается с возрастом. Отчасти это увеличение обусловлено увеличением глиальных клеток, которые содержат главным образом МАО В [43]. Исследования *in vivo* указывают, на существование тонкой регуляции активности МАО в определенных клетках гормонами гипофиза, щитовидной железы и половыми гормонами. Глюкокортикоиды снижают активность МАО *in vivo*, но увеличивают как МАО А, так и МАО В в культуре фибробластов. Понимание эффектов гормонов ожидает результатов молекулярных исследований, которые возможны сейчас. Только один из участков связывания фактора транскрипции идентифицированный до сих пор - Sp1 является общим для МАО А и В [48]. Однако, *cis*-элементы промотерных областей генов МАО А и В различаются, обеспечивая тем самым возможность дифференциальной регуляции.

Редокс регуляция. МАО содержит FAD, который подвергается редокс-превращениям и поэтому на каталитическую функцию мог бы повлиять редокс - статус клетки. Такая регуляция нуждалась бы: 1) в механизме передачи редокс-статуса ферменту; 2) те изменения в системе изменяли бы активность фермента. В окислительной полуреакции индуцированное субстратом увеличение потенциала ускоряет реокисление флавина и увеличивает оборот, осуществляя второе условие. Однако, аминный субстрат не является редокс-сенсором и таким образом это не может рассматриваться как регуляция в ответ редокс-статус. В очищенных препаратах МАО В небольшие варьируемые количества радикального сигнала обусловлены присутствием флаво-семихинона в ферменте и ассоциированы с неактивным ферментом [7, 12]. Измерения редокс-потенциала на нативном ферменте показывают, что семихинон стабилизируется [6], поэтому схема, в которой фермент восстанавливался клеточным редокс-чувствительным элементом до состояния неактивного семихинона, могла бы быть осуществлена. Однако трудно усмотреть какое бы то ни было преимущество для клетки, которая в высоко восстановленном состоянии выключает свою аминоксидазную активность. Это в окисленном состоянии клетка может быть стрессирована образованием H_2O_2 , генерируемым нормальным оборотом МАО [49].

Хотя редокс - контроль МАО *in vivo* еще не исключен, активность МАО не изменяется в ответ на редокс состояние митохондрий [50].

Имидазолин-связывающие домены. Имидазолин-связывающие белки влияют на ионный транспорт и артериальное давление, однако механизмы этих эффектов окончательно не выявлены. Имидазолин - связывающий участок I_2 локализуется на внешней мембране митохондрий и не отделяется от активности МАО при очистке [51]. Этот участок и активность МАО В параллельно увеличиваются с возрастом в мозге человека [52], а экспрессия МАО А печени человека в дрожжах приводила к появлению имидазолин-связывающих участков, которые ранее в дрожжах не обнаруживались [53]. Однако,

аффинность этих новых участков связывания была ниже, чем ожидалось, а соотношение связывания и активности МАО - вариабельно. Фотоаффинно-меченые участки I₂ иммунопреципитировались антителами к той изоформе МАО, которая экспрессируется в данной ткани. Это свидетельствует в пользу того, что имидазолин-связывающие участки есть и на МАО А, и - на МАО В, и что имидазолины могут регулировать активность этих ферментов [54]. Однако, у тромбоцитов, экспрессирующих МАО В, связывание имидазолинов отсутствует. Последнее свидетельствует в пользу того, что имидазолин-связывающий домен экспрессируется как часть МАО тканеспецифическим образом [54]. Функция такого механизма регулирования активности МАО остается неизвестной.

Модуляция активности фермента. Эндогенные ингибиторы, такие как β -карболины и изатин, были идентифицированы в мозге в качестве ингибиторов МАО (см. ниже). Насколько существенно их ингибиторное действие для нормального функционирования этих ферментов неизвестно. Вполне возможно, что эти вещества тормозят активность МАО при патологических, а не физиологических состояниях.

Ингибиторы. Эндогенные ингибиторы. Нормальный метаболизм катехоламинов и индоламинов приводит к образованию не только основных продуктов дезаминирования и метилирования, но также и алкалоидов, образующихся главным образом в ходе неферментативного конденсирования. Изохинолины могут образовываться при конденсации дофамина с карбонильными соединениями, а β -карболины - из триптамина или серотонина. Эти соединения присутствуют в очень низких количествах, но обладают физиологической активностью (см. обзоры [55-56]).

Увеличение содержания этих соединений обнаружено при болезни Паркинсона и наркомании [55, 57]. Алкалоиды тормозят обратный захват нейромедиаторов-моноаминов, являются слабыми агонистами различных рецепторов и ингибируют МАО А [58-59]. Положительно заряженные производные обоих классов являются слабыми ингибиторами митохондриальной электрон-транспортной цепи [60, 61], тормозящими таким образом выработку энергии.

β -карболины являются сильными ингибиторами МАО А [59, 62]. Свойства β -карболинов таковы, что они благоприятствуют поглощению этих соединений системой обратного захвата дофамина [63] и торможению МАО [64]. Поэтому вероятность ингибирования МАО А в дофаминергических клетках (и последующее нарушение метаболизма аминов) высока. Ингибирование МАО А мембран головного мозга человека β -карболинами уже было показано [65], поэтому можно предположить, что гармин, найденный в сигаретном дыму, может вносить свой вклад в торможение МАО, обнаруженное в мозге курильщиков [42]. Данные об индуцированном хлоргилином увеличении в плазме крыс гармина предполагают вытеснение последнего из участков связывания (МАО А, например) и согласуются с ролью β -карболинов в качестве эндогенных ингибиторов МАО А [65].

Связывание β -карболинов с МАО А индуцирует интересные изменения в видимом спектре фермента (рис. 3). Используя очищенную МАО А (клонированный фермент печени человека), кинетические исследования в остановленном потоке показали, что эти изменения происходят очень быстро и заключаются в пертурбации спектра флавина за счет ассоциации ингибитора с активным центром. Таким образом, спектральные изменения могут быть использованы для измерения связывания и структурным параметром, изменяющих связывание. Ингибирование МАО А β -карболинами медленно развивается во времени (примерно за 2 мин), что приводит к более низкой величине K_i , но не изменяет спектр [63]. Данные кругового дихроизма (R.R.Ramsay, N.C.Price, неопубликованные данные) не выявили конформационного изменения, связанного с увеличенным ингибированием.

Механизм кажущегося прочного связывания еще неизвестен, но структурные особенности этого процесса могут быть исследованы спектроскопически.

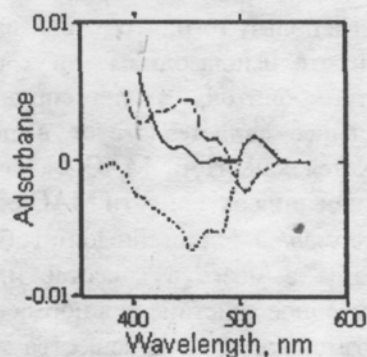


Рис. 3. Субстрат, продукт и ингибитор индуцируют различные спектральные изменения при связывании с МАО А.

Видимый спектр МАО А (10 μM) вычитали из спектра, полученного сразу же после смешивания с субстратом (50 mM α -methylbenzylamine), продуктом (— 0.1 mM 1-methylstilbazolium), или ингибитором (---- 30 μM harmine). Адаптировано из [66].

Следует заметить, что спектральные изменения, индуцированные связыванием медленного субстрата α -метилбензиламина, и продукта - 1-метилстилбазолия, отличались от спектральных изменений, индуцированных связыванием ингибитора (рис. 3). Это предполагает, что связывание лиганда в субстратном участке оказывает различные эффекты на флавин, зависящие от природы лиганда (субстрат, продукт, или ингибитор). Каждый лиганд может индуцировать специфические конформационные изменения, которые влияют на флавин различными путями, приводя к специфическим спектральным изменениям [66].

Фармакологические ингибиторы. Моноаминоксидаза является одной из двух главных мишеней для создания антидепрессантов. Так были разработаны множество ингибиторов [13]. Ингибирование МАО А увеличивает уровень серотонина в мозге, а ингибирование МАО А или МАО В влияет на содержание метаболитов дофамина. Дофамин-сберегающий эффект особенно ингибиторов МАО В делает их важными лекарственными средствами в лечении болезни Паркинсона. Ранние ингибиторы МАО были необратимыми и вызывали серьезные периферические побочные эффекты, связанные с потребляемыми (пищевыми) аминами. Ингибиторы МАО нового поколения являются обратимыми и не обладают побочными эффектами, однако до сих пор непонятно как они взаимодействуют с ферментом и это мешает их дальнейшей разработке.

Недавно была постулирована нейропротекторная роль ингибиторов МАО, которая вытекает из данных о том, что нейротоксин MPP^+ образуется в ходе катализируемого МАО метаболизма МРТР [67]. Депренил замедлял развитие болезни Паркинсона [68], хотя это может происходить за счет эффектов, не связанных с торможением МАО В [69]. Предполагается, что повышение активности МАО В с возрастом является источником увеличения активных форм кислорода, что согласно теории окислительного повреждения имеет важное значение в процессе старения. До сих пор лучшим доказательством того, что это риск являются исследования *in vitro* митохондрий мозга крысы. В присутствии субстратов МАО митохондрии продуцируют H_2O_2 , что приводит к окислительному повреждению митохондриальной ДНК [49].

Необратимые (механизм-активируемые) ингибиторы МАО стали ценными инструментами в исследовании МАО А и МАО В (см. выше). Они позволяют определить точное число активных центров в тканевых препаратах (см., например, [21]), селективно подавить активность одного типа фермента в ткани, содержащей оба, так что можно изучать оставшуюся форму МАО независимо (см., например, [15]). Механизм-активируемые ингибиторы использовали для мечения флавина в МАО при демонстрации различных пептидов у МАО А и В после ограниченного протеолиза [27]. Это было первым существенным доказательством того, что различные ферменты ответственны за А и В активности. Необратимые ингибиторы специально создавали и для изучения химического механизма [9].

Обратимые ингибиторы такие как амфетамин дали возможность продемонстрировать, что окисление бензиламина происходит по механизму образования тройничного комплекса, а не по механизму пинг-понг [16]. Позднее это было подтверждено исследованиями предстационарной кинетики с использованием аналога продукта и конкурентного ингибитора, MPP^+ [3, 4]. Новые обратимые ингибиторы, демонстрирующие зависимость от времени прочное связывание (β -карболины [64], моклобемид [70], бефлосатон [71]) дают новый вызов исследованиям *in vitro* для детальной разработки прочного связывания. А этот механизм в свою очередь представляет фармакологический интерес для контроля продолжительности таких соединения *in vivo*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Исследования *in vivo* и *in vitro* всегда дают комплементарную информацию и МАО не является исключением. Методы молекулярной локализации позволяют сейчас измерять уровни МАО в специфических типах клеток, а не в различных областях, представленных смесью различных клеток. Когда эта информация будет сопоставлена с кинетическими константами, тогда станет возможным сконструировать численные модели для предсказания метаболизма данного амина отдельной клеткой. Эффект конкуренции с другими аминами (метаболитами или аминами экзогенного происхождения), на его метаболизм, эффект варьирования концентрации кислорода, или эффект эндогенного ингибирования могли бы быть предсказаны на основании такой модели в форме, которая могла бы быть экспериментально проверена. И наоборот, молекулярная генетика может выявить варианты МАО, имеющие различную аминокислотную последовательность, что поможет завершить структурно-функциональное понимание этих двух ферментов и того, как они регулируются.

ЛИТЕРАТУРА

1. Singer, T. P. in Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes (Muller, F., Ed.) (1991) Vol III, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 437-470.
2. Weyler, W., Hsu, Y.-P.P., and Breakefield, X.O. Pharmac. Ther. (1990) 47, 391-417.
3. Ramsay, R.R., Koerber, S.C., and Singer, T.P. Biochemistry (1987) 26, 3045-3050.
4. Ramsay, R.R. Biochemistry (1991) 30, 4624-4629.
5. Tan, A.K. and Ramsay, R.R. Biochemistry (1993) 32, 2137-2143.
6. Ramsay, R.R., Sablin, S.O. and Singer T.P. Prog. Brain Res. (1995) 106, 33-39.
7. Yue, K.T., Bhattacharyya, A.K., Zhelyaskov, V.R., and Edmondson, D.E. Arch. Biochem. Biophys. (1993) 300, 178-185.

8. Bach, A.W.J., Lan, N.C., Johnson, D.L., Abell, C.W., Bembenck, M.E., Kwan, S.W., Seeburg, P.H., and Shih, J.C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988) 85, 4934-4938.
9. Silverman, R.B. *Acc. Chem. Res.* (1995) 28, 335-342.
10. Tan, A., Glantz, M.D., Piette, L.H., and Yasunobu, K.T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1983) 117, 517-523.
11. Miller, J.R., Edmondson, D.E. and Grissom, C.B. *J. Am. Chem. Soc.* (1995) 117, 7830-7831.
12. Deroose, V.J., Woo, J.C.G., Hawe, W.P., Hoffman, B.M., and Silverman, R.B. and Yelekci, K. *Biochemistry* (1996) 35, 11085-11091.
13. Fowler, C.J. and Ross, S.B. *Medicinal Res. Rev.* (1984) 4, 323-358.
14. Fowler, C.J. and Callingham, B.A. *Biochem. Pharmacol.* (1978) 27, 1995-2000.
15. Houslay, M.D. and Tipton, K.F. *Biochem. J.* (1973) 135, 735-750.
16. Pearce, L.B. and Roth, J.A. *Biochemistry* (1985) 24, 1821-1826.
17. Ramsay, A.K. Tan, and W. Weyler, J. *Neural. Trans.* (1994) 41 (Suppl.), 17-26.
18. Husain, M., Edmondson, D.E., and Singer, T.P. *Biochemistry* (1982) 21, 595-600.
19. Tipton, K.F. and Singer, T.P. *Biochem. Pharmacol.* (1993), 46, 1311-1316.
20. Krueger, M.J., Singer, T.P. *Anal. Biochem.* (1993), 214, 116-123.
21. Riley, L.A. and Denney, R.M. *Biochem. Pharmacol.* (1991) 42, 1953-1959.
22. Fowler, C.J. and Tipton, K.F. *J. Neurochem.* (1992) 38, 733-736.
23. Heikkila, R.E., Manzino, L., Cabbat, F.S., and Duvoisin, R.C. *Nature* (1984) 311, 467-469.
24. Singer, T.P. and Ramsay, R.R. *FEBS Lett.* (1990) 274, 1-8.
25. Youngster, S.K., K. A. McKeown, Y.-Z. Jin, R. R. Ramsay, R. E. Heikkila, and T. P. Singer, *J. Neurochem.* (1989) 53, 1837-1842.
26. Efange, S.M.N. and Boudreau, R.J. *J. Comput.-Aided Molec. Design* (1991) 5, 405-417.
27. Nagy, J. and Salach, J.I. *Arch. Biochem. Biophys.* (1981) 208, 388-394.
28. Cesura, A.M., Gottowik, J., Lahm, H.W., Lang, G., Imhof, R., Malherbe, P., Rothlisberger, U., and DaPrada, M. *Eur. J. Biochem.* (1996) 236, 996-1002.
29. Weyler, W. and Salach, J.I. *J. Biol. Chem.* (1985) 260, 13199-13207.
30. Singer, T.P. and Barron, E.S.G. *J. Biol. Chem.* (1945) 157, 241-253.
31. Gomes, B., Kloepper, H.G., Oi, S., and Yasunobu, K.T. *Biochim. Biophys. Acta* (1976) 438, 347-357.
32. Paech, C., Salach, J.I., and Singer, T.P. *J. Biol. Chem.* (1980) 255, 2700-2704.
33. Silverman, R.B. and Zieske, P.A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1986) 135, 154-159.
34. Wu, H.-E., Chen, K., and Shih, J.C. *Mol. Pharmacol.* (1993) 43, 888-893.
35. Kwan, S.W., Lewis, D.A., Zhou, B.P., and Abell, C.W., *Arch. Biochem. Biophys.* (1995) 316, 385-391.
36. Zhou, B.P., Lewis, D.A., Kwan, S.W., Kirksey, T.J., and Abell, C.W. *Biochemistry* (1995) 34, 9526-9531.
37. Gottowik, J., Malherbe, P., Lang, G., Daprada, M., and Cesura, A.M. *Eur. J. Biochem.* (1995) 230, 934-942.
38. Grimsby, J., Zentner, M., and Shih, J.C. *Life Sciences* (1996) 58, 777-787.
39. Tsugeno, Y., Hirashiki, I., Ogata, F., and Ito, A. *J. Biochem.* (1995) 118, 974-980.
40. Grimsby, J., Zentner, M., and Shih, J.C. *Life Sci.* (1996) 58, 777-787.
41. Fowler, J.S., MacGregor, R.R., Wolf, A.P., Arnett, C.D., Dewey, S.L., Schlyer, D., Christman, D., Logan, J., Smith, M., Sachs, H., Aquilonius, S.M., Bjurling, P., Halldin, C.,

- Hartvig, P., Leenders, K.L., Lundqvist, H., Oreland, L., Stalnacke, C.G., and Langstrom, B. *Science* (1987) 235, 481-485.
42. Fowler, J.S., Volkow, N.D., Wang, G.-J., Pappas, N., Logan, J., McGregor, R., Alexoff, D., Shea, C., Schlyer, D., Wolf, A.P., Warner, D., Zezukova, I. and Cilento, R. *Nature* (1996), 379, 733-736.
43. Levitt, P., Pintar, J.E. and Breakefield, X.O. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1982) 79, 6385-6389.
44. Westlund, K.N., Denney, R.M., Kochersperger, L.M., Rose, R.M. and Abell, C.W. *Science* (1985) 230, 181-183.
45. Westlund, K.N., Krakower, T.J., Kwan, S.W., and Abell, C.W. *Brain Res.* (1993) 612, 221-230.
46. Saura, J., Bleuel, Z., Ulrich, J., Mendelowitsch, A., Chen, K., Shih, J.C., Malherbe, P., Daprada, M., Richards, J.G. *Neuroscience* (1996) 70, 755-774.
47. Jahng, J.W., Houpt, T.A., Wessel, T.C., Chen, K. Shih, J.C., and Joh, T.H. *Synapse* (1997) 25, 30-36.
48. Zhu, Q., Grimsby, J. Chen, K., and Shih, J.C. *J. Neurosci.* (1992) 12, 4437-4446.
49. Hauptmann, N., Grimsby, J., Shih, J.C. and Cadenas, E. *Arch. Biochem. Biophys.* (1996) 335, 295-304.
50. Wojtczak, A.B., Brdiczka, D., and Wojtczak, L. *Biochim. Biophys. Acta* (1995), 1229,
51. Tesson, F., Prip-Buus, C., Lemoine, A., Pregorier, J.-P., and Parini, A. *J. Biol. Chem.* (1991) 266, 155-160.
52. Sastre, M. and GarcTa-Sevilla, J. *J. Neurochem.* (1993) 61, 881-889.
53. Tesson, F., Limon-Boulez, I., Urban, P., Puype, M., Vanderkerckhove, J., Couprie, I., Pompon, D., and Parini, A. *J. Biol. Chem.* (1995) 270, 9856-9861.
54. Raddatz, R., Parini, A., and Lanier, S.M. *J. Biol. Chem.* (1995) 270, 27961-27968.
55. Melchior, C. and Collins, M.A. *CRC Rev. Toxicol.* (1982) 9, 313-356
56. Matsubara, K., Collins, M.A., Akane, A., Ikebuchi, J., Neafsey, E.J., Kagawa, M., Shiono, H. *Brain Res.* (1993) 610, 90-96.
57. Kuhn, W., Muller, T., Grosse, H., Rommelspacher, H., *J. Neural Trans.* (1996) 103, 1435-1440
58. Thull, U., Kneubuhler, S., Gaillard, S., Carrupt, P.A., Testa, B., Altomare, C., Carotti, A., Jenner, P. and McNaught, K.S.P. *Biochem. Pharmacol.* (1995) 50, 869-877.
59. Ho, B.T., McIsaac, W.M., Walker, K.E. and Estevez, V. *J. Pharm. Sci.* (1968) 57, 269-274.
60. Suzuki, K., Minzumo, Y., and Yoshida, M. in *Basic, Clinical and Therapeutic Aspects of Alzheimer's and Parkinson's Diseases* Vol. 1 (Nagatsu, T., Fisher, A., Yoshida, M., eds) (1990) Plenum Press, New York, pp. 309-312.
61. Albores, R., Neafsey, E.J., Drucker, G., Fields, J.Z. and Collins, M.A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1990) USA 87, 9368-9372.
62. May, T., Rommelspacher, H. and Pawlik, M. *J. Neurochem.* (1991) 56, 490-499.
63. Drucker, G., Raikoff, K., Neafsey, E.J. and Collins, M.A. *Brain Res.* (1990) 509, 125-133.
64. Kim, H., Sablin, S.O., and Ramsay, R.R. *Arch. Biochem. Biophys.* (1997) 337, 137-142.
65. Rommelspacher, H., May, T. and Salewski, B. *Eur. J. Pharmacol.* (1994) 252, 51-59.
66. Sablin, S.O. and Ramsay, R.R. *Biochem. Soc. Trans.* (1995), 23, 457S.
67. Heikkila, R.E., Manzino, L., Cabbat, F.S., and Duvoisin, R.C. *Nature* (1984) 311, 467-470.
68. Tertrud, J.W. and Langston, J.W. *Science* (1989) 145, 519-522.

- Tatton, W.G. and Greenwood, C.E. J. Neurosci. Res. (1991) 30, 666-672.
- Cesura, A.M., Kettler, R., Imhof, R., and DaPrada, M. Psychopharmacol. (1992) 106, S15-S16.
- Curet, O., Damoiseau, G., Aubin, N., Sontag, N., Rovei, V., and Jarreau, F.X. J. Pharmacol. Exp. Therap. (1996), 277, 253-264.

Mechanistic studies on MAO - implications for the A and B forms *in situ*.

RONA R. RAMSAY

School of Biological and Medical Sciences, University of St Andrews,
Irvine Building, North Street, St. Andrews, Fife, KY16 9AL, Scotland, U.K

MAO A and MAO B follow the same chemical mechanism to oxidise primary, secondary, and tertiary amines, but they are distinguished by differences in their substrate and inhibitor specificities and in their kinetic behaviour. Studies on the purified enzymes show that monoamine oxidases are unusual enzymes because certain amine substrates accelerate the oxidative half-reaction (much more in A than in B) and because substrate binding induces an enormous positive shift in the redox potential of the flavin. The molecular basis of these features is still unknown, as is the structure of the active site, information necessary for rational drug design.

This article reviews the biochemistry of MAO in general and speculates about what the kinetic and thermodynamic properties observed in the isolated enzymes mean for the catalytic expression of their amine oxidase activities *in vivo*. Specific and distinct physiological roles for MAO A and MAO B are probable because they are expressed in different proportions in different cell types and their expression varies in development and ageing. Molecular localization techniques can now be used to measure the levels of MAO in specific cell types rather than a region of mixed cells. When this information is combined with the kinetic constants, it will be possible to construct numerical models to predict the metabolism of a given amine by a particular cell which should help in understanding the role of amines in development and perhaps also the role of the endogenous inhibitors in altering levels of bioactive amines.

Key words: monoamine oxidase, kinetic and thermodynamic properties, physiological regulation