

КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ

УДК 577.158.2

©Коллектив авторов

МОДЕЛИРОВАНИЕ АКТИВНОГО ЦЕНТРА МОНОАМИНОКСИДАЗЫ ТИПА Б МЕТОДОМ ПОСТРОЕНИЯ СЛЕПКА.

А.В.ВЕСЕЛОВСКИЙ, О.В.ТИХОНОВА, А.С.ИВАНОВ, А.Е.МЕДВЕДЕВ

НИИ биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича РАМН,
Москва, Погодинская 10,
факс: 007-095-245-0857; Эл. Почта: veselov@ibmh.msk.su

На основании разработанного ранее подхода по моделированию структуры активного центра ферментов с неизвестной пространственной структурой (метод слепка) (Веселовский и др. *Биохимия*, **65**, 1072-1079) построена модель активного центра фермента моноаминоксидазы МАО Б. Показано, что построенная модель хорошо отражает форму и размер участка связывания субстратов и ингибиторов в полости активного центра этого фермента. Сопоставление слепков активных центров МАО А и Б показало, что активные центры этих ферментов отличаются между собой по размерам и форме. Оценка достоверности полученной модели активного центра МАО Б была проведена с использованием трех соединений, различающихся по ингибиторной активности, относящихся к разным химическим классам и имеющих заместители в различных положениях. Показано, что слабые ингибиторы МАО Б не могут поместиться в полости активного центра, тогда как у их "гибких" близких аналогов (эффективно тормозящих активность МАО Б) существуют конформации, позволяющие им поместиться в построенной полости. Это указывает, что построенный слепок правильно отражает структуру активного центра МАО Б. Построенный слепок МАО Б может быть использован для поиска новых ингибиторов этого фермента и предварительной оценки перспективности их синтеза и биологического тестирования.

Ключевые слова: моноаминоксидаза Б, субстрат-связывающий центр, моделирование, компьютерное конструирование лекарственных средств.

ВВЕДЕНИЕ. Изучение механизма функционирования фермента и поиск его новых лигандов наиболее эффективны, когда известна пространственная структура этого белка. Пространственные структуры белков определяют

рентгеноструктурным анализом или ЯМР-спектроскопией. Однако большинство ферментов, для которых определены такие структуры, относятся к водорастворимым белкам и лишь немногие из них являются мембраносвязанными.

Моноаминоксидаза (МАО; КФ 1.4.3.4) относится к интегральным белкам внешней мембраны митохондрий, которые в процессе выделения и очистки легко агрегируют [1], вследствие этого их пространственная структура остается неизвестной. Этот фермент играет центральную роль в метаболизме важнейших нейромедиаторов-моноаминов, а изменение его активности при многих нервнопсихических расстройствах и возможность их коррекции специфическими ингибиторами сделали МАО популярным объектом фундаментальных и клинических исследований [2]. В организме млекопитающих МАО присутствует в двух формах: МАО А и МАО Б, которые кодируются разными, хотя и очень похожими генами [3] и различаются по чувствительности к ингибиторам и по субстратной специфичности [2].

Анализ последовательностей, конструирование химерных молекул и точечный мутагенез позволили определить участки белка, ответственные за связывание с флавиновым кофактором, а также области, определяющие взаимодействие с субстратами и ингибиторами [4-7]. Были определены несколько ключевых аминокислот, ответственных за связывание субстрата [8-10] и участвующих в катализе [11]. Однако все эти данные не позволяют определить пространственное строение МАО [12, 13].

Наши оценки, основанные на измерении размеров нескольких серий обратимых конкурентных (и селективных) ингибиторов с жесткой структурой, показали, что «длина» субстрат-связывающего центра МАО А не превышает 13-14 Å, а «ширина» и «высота» - 7 и 4,4 Å соответственно [12, 14]. Субстратсвязывающий центр МАО Б «короче» (8,5 Å) и «уже» (5,0 Å) [14-15].

Ранее мы предложили метод по моделированию структуры активного центра фермента с неизвестной пространственной структурой, основанный на анализе и наложении друг на друга высокоэффективных лигандов этого фермента (метод слепка) [16, 17]. Этот подход позволяет предсказать размеры и структуру субстрат/ингибиторного участка активного центра фермента. На основании этого метода построен слепок активного центра МАО А, хорошо отражающий структуру активного центра фермента, и этот слепок можно использовать для поиска новых лигандов фермента в базах данных низкомолекулярных веществ [16-18].

В этой работе продолжен анализ структурных особенностей МАО А и МАО Б и построен слепок активного центра МАО Б.

МЕТОДИКА. В работе были использованы собственные и литературные данные по ингибированию активности МАО А и МАО Б обратимыми конкурентными ингибиторами.

Компьютерное моделирование выполняли с использованием программ из молекулярно-графического пакета "SYBYL 6.4" (фирма TRIPOS Inc.) [19] на графической рабочей станции Indigo 2 и сервере Origin 200 (фирма Silicon Graphics, Inc.). Построенные трехмерные модели молекул ингибиторов ферментов оптимизировали с использованием стандартного поля сил Tripos. Парциальные заряды на атомах были рассчитаны полуэмпирическим квантово-механическим

методом AM1. Расчет конформаций молекул выполняли с помощью программы RandomSearch.

В работе также использована молекулярная база данных "MDL Drug Data Report" (MDDR) фирмы MDL Information Systems, Inc.

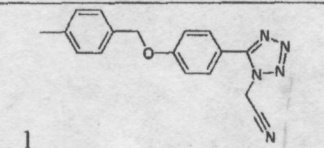
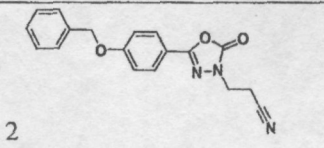
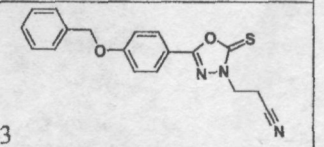
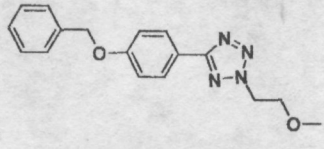
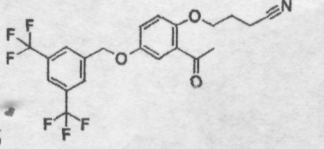
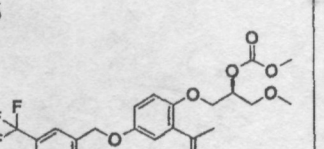
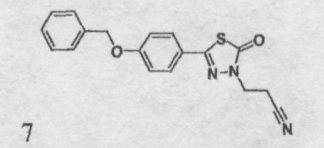
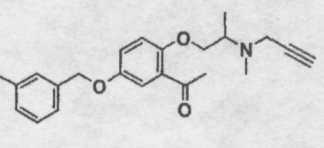
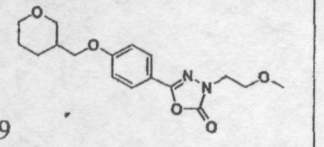
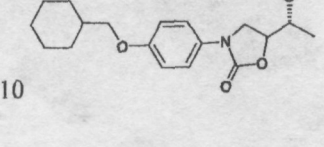
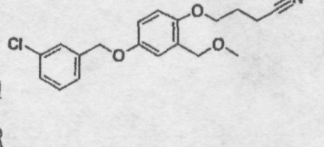
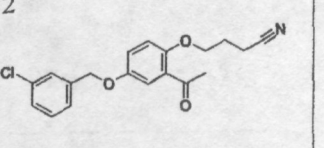

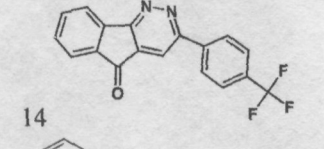
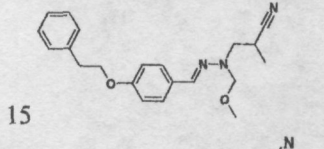
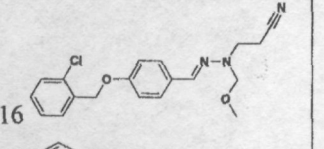
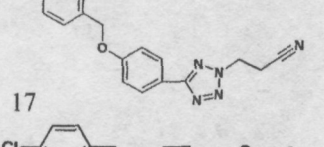
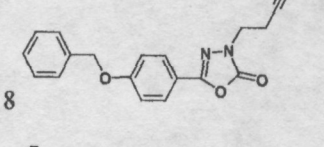
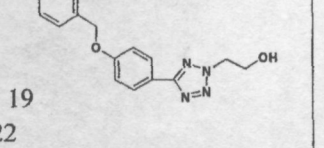
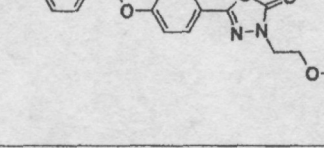
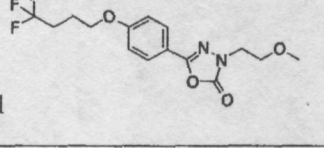
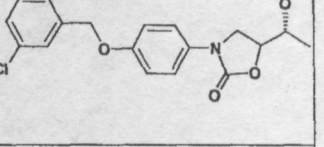
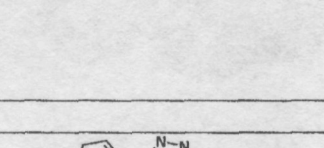
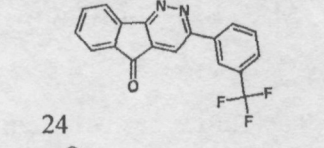
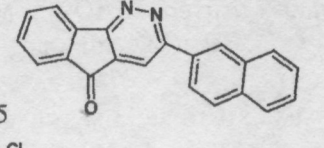
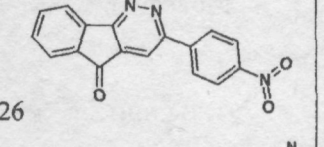
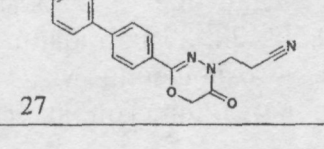
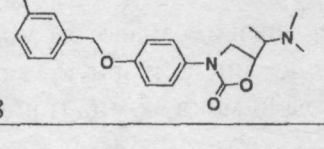
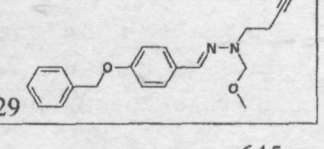
РЕЗУЛЬТАТЫ. Метод построения слепка основан на постулате, что для взаимодействия лигандов (субстратов и конкурентных обратимых ингибиторов) с ферментом необходима молекулярная комплементарность этих соединений и участка их связывания в активном центре (в том числе и стерическое соответствие). Лиганды, относящиеся к различным химическим классам веществ, могут связываться с разными участками активного центра фермента. Тогда совокупность поверхностей этих лигандов, наложенных друг на друга, должна отражать структуру поверхности участка связывания субстратов/ингибиторов в активном центре.

Построение структуры активного центра фермента с неизвестной пространственной структурой по его эффективным лигандам (метод слепка) состоит из двух этапов. На первом этапе необходимо определить правила выравнивания базовых структур лигандов из разных химических классов, на втором – определить пространственное положение их боковых радикалов на основании пространственного совпадения группировок, часто участвующих в связывании с белком (ароматические кольца, гетероатомы и др.) [16]. Для этого же можно использовать дополнительные данные о стереоселективности, результаты трехмерного QSAR-анализа и т.д. Построению слепка с активного центра фермента может способствовать наличие лигандов с жесткой структурой. Последнее обстоятельство значительно сокращает количество возможных конформеров. Соединения с такой структурой могут быть использованы в качестве остова при построении слепка.

Структуры ингибиторов MAO Б, использованных для построения слепка активного центра этого фермента, представлены в таблице 1. Сравнительный анализ показал, что общими структурными элементами для всех ингибиторов являются фенольное кольцо, рядом с которым или через один атом углерода располагается отрицательно заряженный атом кислорода или азота. Это соответствует предложенной нами ранее фармакофорной модели для ингибиторов MAO Б [23]. Молекулы были выровнены по вышеуказанным структурным элементам. В качестве остова при построении слепка использовали молекулы с жесткой структурой (14, 24 – 27, табл. 1). При конформационном анализе боковых радикалов ингибиторов MAO Б были совмещены тетразольные кольца молекул 9, 11, 19, 21 и диазогруппы, находящиеся как в составе различных циклов (молекулы 1 – 3, 7, 8, 14, 23 – 27, табл. 1), так и в составе гибких цепей (молекулы 15, 16, 29); цианогруппы молекул 1, 2, 4 – 6, 15, 16, 18, 20, 21, 23, 27 и 29; атомы кислорода молекул 3, 8, 9, 11, 15 – 17 и 29. Кроме того, при построении слепка учитывали данные 3D-QSAR с CoMFA (сравнительный анализ молекулярных полей) моделей производных пиразидола для MAO Б, из которых следовало, что в районе заместителя 8 этих соединений находится стерическое ограничение в активном центре MAO Б [14]. Полученный слепок активного центра MAO Б представлен на рисунке 1а. Для сравнения на рисунке 1б приведен слепок MAO А, полученный ранее [16].

Для оценки достоверности полученной модели активного центра MAO Б были использованы три соединения, различающиеся по ингибиторной активности

Таблица 1. Структура ингибиторов МАО Б, использованных при построении слепка с активного центра этого фермента. [20-22, 24, 25]

Нет данных		
		
		
		
		
		
0,0001-0,1 мкМ		
		
		
		
		
0,1-3 мкМ		
		
		

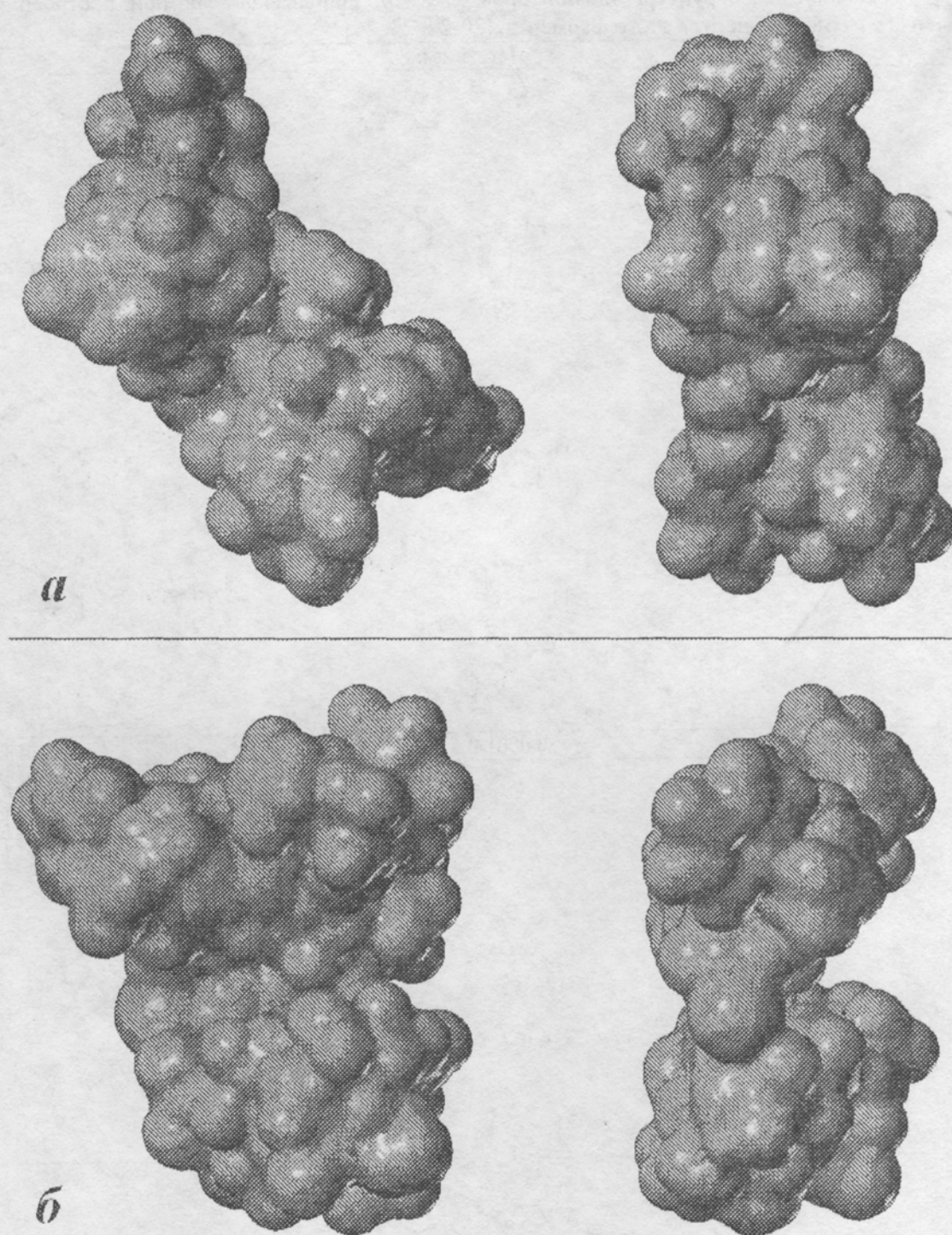
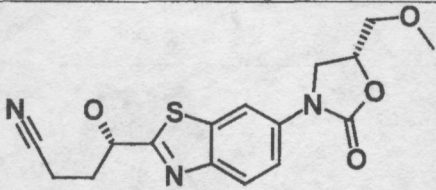
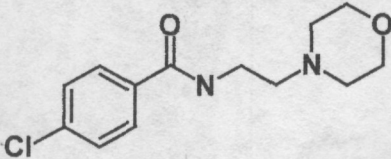
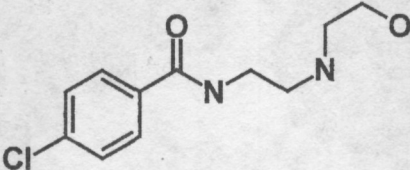


Рисунок 1.
 Модели структур активных центров MAO A и MAO Б. *a* – MAO Б; *б* – MAO А (из Веселовский и др., 2000)

и относящиеся к разным химическим классам (и имеющие заместители в различных положениях; см. табл. 2). Первое соединение (из класса оксазолидонов) является близким аналогом молекул 10, 13, 22, 28 из таблицы 1, но показывающее низкую ингибиторную активность в отношении MAO Б. Другими соединениями были моклобемид (применяемый в медицинской практике

слабый ингибитор МАО Б) и родственное ему соединение Ro 16-3177 (высокоэффективный ингибитор МАО Б) (табл. 2). Молекулы были выровнены по фармакофорной модели для МАО Б (ароматическое кольцо и отрицательно заряженный атом) и их структуры сопоставлены с полостью слепка активного центра МАО Б (рис. 2). Видно, что оксазолидоновое производное (плохой ингибитор МАО Б) вследствие достаточно длинного и жесткого заместителя не может поместиться в полости активного центра (рис. 2а). Тогда как его близкий аналог (эффективный ингибитор МАО Б, соединение – 22 из таблицы 1), но имеющий гибкий заместитель, помещается в построенной полости (рис. 2б). Похожая ситуация наблюдалась и для моклобемида и его аналога (рис. 2в и 2г). Видно, что моклобеמיד не может поместиться в полости построенного активного центра (рис. 2в), тогда как для его "гибкого" близкого аналога (эффективного ингибитора МАО Б) существует конформация, позволяющая ему поместиться в построенной полости (рис. 2г). Последнее указывает, что в этих областях построенный слепок правильно отражает структуру активного центра МАО Б.

Таблица 2. Структуры тестовых соединений и их величины ингибиторной активности IC_{50} (мкМ) МАО А и Б.

Название	Структура	МАО А	МАО Б
Е-2011		0,03	0,92
Моклобеמיד		4	>1000
Ro 16-3177		13	10

ОБСУЖДЕНИЕ. Отсутствие данных о пространственной структуре МАО сдерживает создание новых ингибиторов, которые могут быть использованы при лечении различных нейродегенеративных заболеваний. Многочисленные попытки предсказать структуру активных центров этих ферментов [22], создать химерные молекулы из МАО А и Б [6, 7, 27], определить ключевые аминокислоты [8-10] пока не привели к пониманию структур их активных центров.

Ранее мы предложили метод моделирования пространственной структуры активного центра фермента с неизвестной структурой и на его основе построили слепок активного центра МАО А, который достаточно хорошо отражает его форму и размеры [16-17]. Он позволяет оценить способность нового соединения хорошо располагаться в активном центре и, соответственно, следует ли от него

ожидать высокую активность, а так же проводить поиск новых соединений в молекулярных базах данных [16-18].

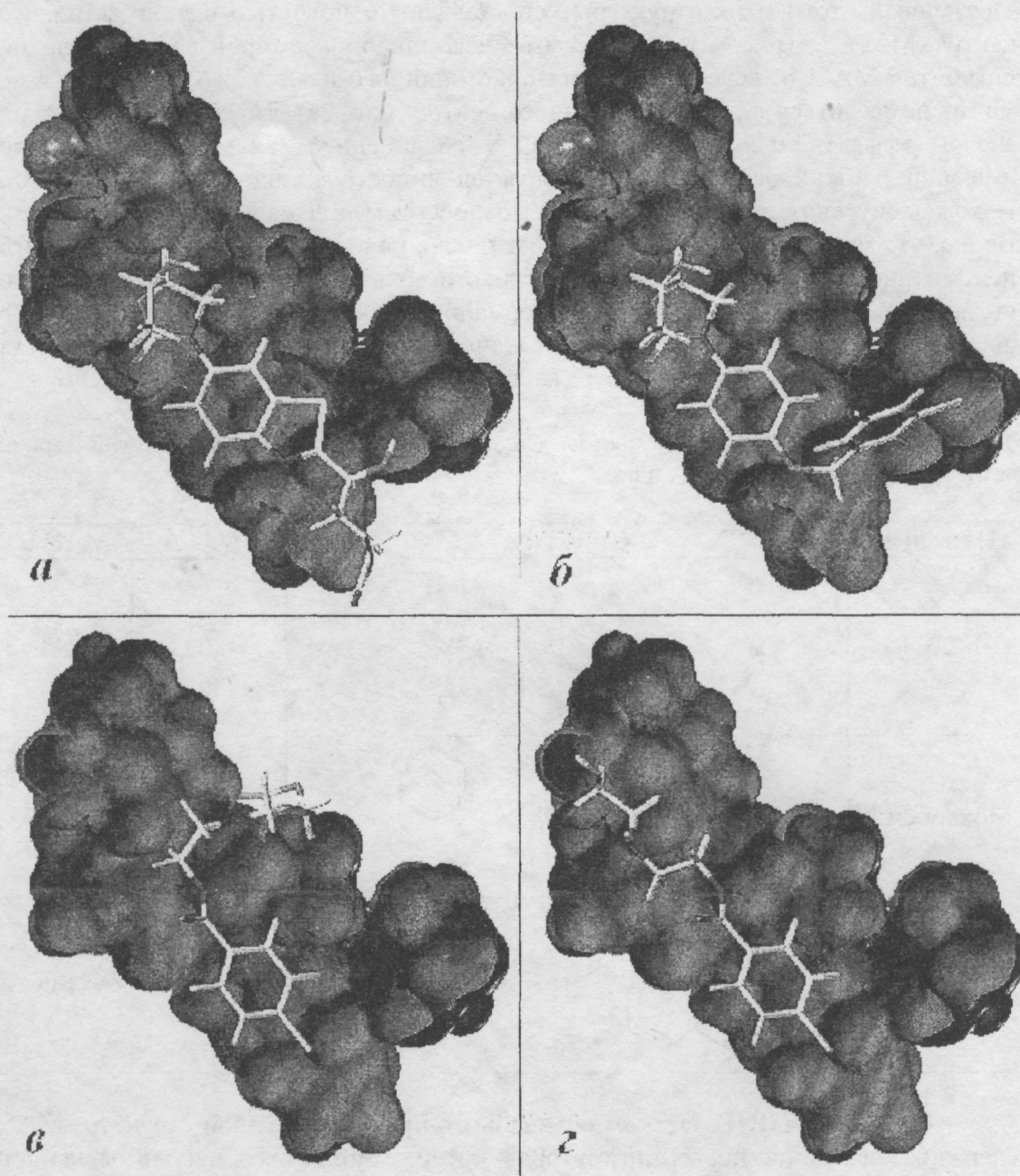


Рисунок 2.

Расположение тестовых молекул в полости активного центра MAO Б. а - E-2011; б - молекула 22 из таблицы 1; в - моклобемид; г - Ro 16-3177.

В данной работе нами был построен слепок активного центра MAO Б (рис. 1а) на основании 29 эффективных ингибиторов этого фермента (табл. 1). Оценка адекватности построенной модели с помощью соединений, не участвующих в построении данной модели показало, что данный слепок достаточно хорошо отражает структуру активного центра MAO Б. Так, моклобемид, являющийся слабым ингибитором MAO Б ($IC_{50} \sim 1$ мМ), не помещается в полость активного

центра МАО Б (рис. 2в), тогда как его "гибкий" структурный аналог (Ro 16-3177) может принять конформацию, при которой он хорошо помещается в полость. Это соединение было исходно синтезировано как ингибитор МАО А, однако оно показывает также высокую ингибиторную активность и в отношении МАО Б (IC_{50} 13 и 10 нМ для МАО А и МАО Б соответственно) [28]. Причины такого резкого (на два порядка) усиления ингибиторной активности Ro 16-3177 для МАО Б по сравнению с моклобемидом до сих пор не установлены. На основании нашего анализа можно предположить, что это связано с увеличением гибкости структуры Ro 16-3177 по сравнению с моклобемидом, позволяющее ему принять конформацию, помещающуюся в подости активного центра и комплементарную его поверхности. В случае производных оксазолидонов прослеживается сходная тенденция. Соединение с жестким циклом, сопряженным с ароматическим кольцом (что приводит к увеличению длины молекулы) было намного более слабым ингибитором МАО Б (молекула E-2011, табл. 2 и рис. 2а), чем более длинная молекула, но имеющая в этой области относительно гибкий заместитель (молекула 22 таблицы 1 и рис. 2б). Следует отметить, что большинство производных оксазолидонов, обладающих ароматическим кольцом, сопряженным с другим циклом, являются высоко селективными ингибиторами для МАО А [28]. Поскольку проверочные соединения имеют критические группировки в разных областях пространства, это указывает, что построенный слепок МАО Б достаточно адекватно отражает структуру активного центра этого фермента.

Сопоставление предложенных слепков активных центров МАО А и Б показывает, что у МАО А он больше, чем у МАО Б (рис. 1). Это согласуется с рядом литературных данных. Так, например, некоторые авторы предполагают наличие гидрофобного кармана в структуре активных центров, причем в МАО А он больше, чем в МАО Б [29, 30]. При изучении гибких аналогов метилфенилтетрагидропиридина было обнаружено, что соединения с более крупными заместителями являются более эффективными ингибиторами МАО А, чем МАО Б [31]. Наши данные показывают, что селективные ингибиторы МАО А (аналоги индола, изатина и производных пиразинокарбазолов) также имеют большие размеры, чем ингибиторы МАО Б [14-15].

Построенный слепок активного центра МАО Б совместно с ранее предложенной подобной моделью для МАО А позволяют оценить размеры и форму активных центров этих ферментов. Это может способствовать более направленному и эффективному поиску и разработке, с одной стороны, новых селективных ингибиторов для каждого типа этих ферментов, а с другой – неселективных обратимых ингибиторов, к которым в последнее время резко повысился интерес в связи с необходимостью повышения эффективности антидепрессантов [32].

Данная работа поддержана грантами РФФИ (№01-04-48128) и ИНТАС (№99-00433).

Когда статья уже была принята к печати в банке данных трехмерных структур белка (PDB) появилась структура моноаминоксидазы Б человека (дата последней проверки структуры 29.11.2001 г.). В этой связи представляется актуальным сравнение предсказанной структуры активного

центра МАО Б с экспериментально определенной структурой этого белка, что и будет сделано в самое ближайшее время.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сингер Т.П., Янковская В.Л., Бернард С., Кронин К., Саблин С.О. (1997) *Вопр. мед. химии*, **43**, 440-456.
2. Горкин В.З., Медведев А.Е. (1995) в кн.: *Белки и пептиды*, Т. 1, Наука, Москва, с. 83-88.
3. Shih J.C., Chen K., and Ridd M.J. (1999) *Annu. Rev. Neurosci.* **22**, 197-217.
4. Zhou B.P., Lewis D.A., Kwan S.W., Kirksey T.J., and Abell C.W. (1995) *Biochemistry*, **34**, 9526-9531.
5. Tsugeno Y., Hirashiki I., Ogata F., and Ito A. (1995) *J. Biochem.*, **118**, 974-980.
6. Chen K., Wu H.F., and Shih J.C. (1996) *J. Neurochem.*, **66**, 797-803.
7. Grimsby J., Zentner M., and Shih J.C. (1996) *Life. Sci.*, **58**, 777-787.
8. Tsugeno Y., and Ito A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 14033-14036.
9. Geha R., Chen K., and Shih J. (2000) *J. Neurochem.*, **75**, 1304-1309.
10. Geha R., Chen K., and Shih J. (2000) in 9th Int. Amine Oxidase Workshop, The Millenium Meeting, Barcelona, p. 59.
11. Cesura AM, Gottowik J, Lang G, Malherbe P, and Da Prada M. (1998) *J. Neural. Transm.*, **52(Suppl)**, 189-200.
12. Веселовский А.В., Иванов А.С., Медведев А.Е. (1998) *Биохимия*, **63**, 1695-1701.
13. Медведев А. Е., Иванов А.С., Веселовский А. В. (2001) *Биохимия*, **66**, 718-720.
14. Medvedev A.E., Veselovsky A.V., Shvedov V.I., Tikhonova O.V., Moskvitina T.A. Fedotova, O.A., Axenova L.N., Kamyshanskaya N.S., Kinkel A.Z., and Ivanov A.S. (1998) *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **38**, 1137-1144.
15. Medvedev A. E., Ivanov A.S., Kamyshanskaya N. S., Kinkel A. Z., Moskvitina T. A., Gorkin V. Z., Li N. Y., and Marshakov V. Yu. (1995) *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **36**, 113-122.
16. Веселовский А.В., Медведев А.Е., Тихонова О.В., Скворцов В.С., Иванов А.С. (2000) *Биохимия*, **65**, 1072-1079.
17. Veselovsky A.V., Tikhonova O.V., Skvortsov V.S., Medvedev A.E., and Ivanov A.S. (2001) *QSAR and SAR in Environmental Research*. 2001. **12**. 345-358.
18. Medvedev A.E., Ivanov A.S., and Veselovsky A V. (2000) in: "Monoamine oxidases, milestones in deprenyl research", Medicina Publisher House Co., Budapest, (Eds. K.Magyar, E.S.Vizi). p. 33-50.
19. SYBYL 6.4. Tripos Inc. 1699 South Hanley Road. St. Louis. Missouri. 63144. USA.
20. Kneubuhler S., Thull U., Altomare C., Carta V., Gaillard P., Carrupt P.-A., Carotti A., and Testa B. (1995) *J. Med. Chem.*, **38**, 3874-3883.
21. Bernard S., Paillat C., Oddos T., Seman M., and Milcent R. (1995) *Eur. J. Med. Chem.*, **30**, 471-482.
22. Wouters J. (1998) *Curr. Med. Chem.*, **5**, 137-162.

23. Medvedev A.E., Ivanov A.S., Veselovsky A.V., Skvortsov V.S., and Archakov A.I. (1996) *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **36**, 664-671.
24. Lebreton L., Curet O., Gueddari S., Mazouz F., Bernard S., Burstein C., and Milcent R. (1995) *J. Med. Chem.*, **38**, 4786-4792.
25. ISISTM/Base: MDL Drug Data Report, Molecular Design Limited Information Systems, Inc., 14600 Catalina Street, San Leandro, California, 94577, USA. 1997.
26. Medvedev A.E., Ivanov A.S., Veselovsky A.V., Skvortsov V.S., and Archakov A.I. (1996) *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **36**, 664-671.
27. Gottowik J., Malherbe P., Lang G., Daprada M., and Cesura A.M. (1995) *Eur. J. Biochem.*, **230**, 934-942.
28. Cesura A.M., and Pletscher A. (1992) *Progr. Drug Res.*, **38**, 171-297.
29. Mabic S., and Castagnoli N. (1996) *J. Med. Chem.*, **39**, 3694-3700.
30. Palmer S.L., Mabic S., and Castagnoli N. (1997) *J. Med. Chem.*, **40**, 1982-1989.
31. Krueger M.J., Efange S.M.N., Michelson R.H., and Singer T.P. (1992) *Biochemistry.*, **31**, 5611-5615.
32. Glover V. 1997 In: *Antidepressant: New pharmacological strategies*. Ed.: Skolnick Ph. Humana press, Toto, NJ p. 69-80.

Поступила 6.08.01

MONOAMINE OXIDASE B ACTIVE SITE MODELLING BY MEANS OF COMPUTER MOULDING

A.V.VESELOVSKY, O.V.TIKHONOVA, A.S.IVANOV, A.E.MEDVEDEV

Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119992 Russia, fax: 007-095-245-0857;
e-mail: veselov@ibmh.msk.su

Using previously developed approach for active site modelling of enzymes with unknown spatial structure (*Veselovsky et al.*, *Biochemistry* (Moscow), **65**, 1072-1079) substrate/inhibitor binding site of monoamine oxidase B was designed by means of computer moulding. This mould corresponds to the shape and volume size of selective substrates and inhibitors of this enzyme. Active site moulds of monoamine oxidases A and B exhibit significant differences in these parameters. The correctness of the resultant model of monoamine oxidase B active site was validated by using three compounds which were not employed in the training sets. Weak inhibitors were not accommodated in the mould whereas their "flexible" analogues exhibiting rather potent inhibition are readily accommodated in this mould. This suggests that our mould reflects some important spatial features of monoamine oxidase B active site. This mould can be employed for screening of new perspective inhibitor of monoamine oxidase B and pilot evaluation of their monoamine oxidase B inhibitory activity.

Key words: monoamine oxidase B, substrate/inhibitor binding region, active site, modelling, computer-aided drug design