

LuK-tutkielma

**Uusien monoamiinioksidaasi B:n inhibiittorien
hyödyntäminen lääkeainetutkimuksessa**

Pekka Roivas & Sami Salmikangas



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Solu- ja molekyylibiologia

24.5.2018

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Solu- ja molekyylibiologia

Roivas, P. & Salmikangas, S.: Uusien monoamiinioksidaasi B:n inhibiittorien hyödyntäminen lääkeainetutkimuksessa

LuK-tutkielma: 31 sivua
Työn ohjaajat: FT Ulla Pentikäinen, FT Tatu Haataja, FT Pekka Postila
Toukokuu 2018

Hakusanat: Fosfataasiaktiivisuus, inhibiittori, lääkeainesuunnittelu, MAO-B, monoamiinioksidaasi, sitoutumistasku, telakointi.

TIIVISTELMÄ

Monoamiinioksidaasi (MAO) on entsyymi, jonka kahta eri alamuotoa (MAO-A ja MAO-B) esiintyy mitokondrioiden ulkokalvoilla. MAO-entsyymit katalysoivat monoamiinien, kuten dopamiinin, serotoniinin ja adrenaliinin, oksidatiivista deaminaatiota. MAO-entsyymien liiallinen aktiivisuus hermosoluissa aiheuttaa muun muassa Parkinsonin- ja Alzheimerin tautia, dementiaa ja masennusta. MAO-B:tä esiintyy lähinnä hermosoluissa, kun taas MAO-A:ta esiintyy myös sisäelimissä, joten MAO-B:lle selektiiviset inhibiittorit ovat hyviä lääkkeitä monien neurologisten tautien hoidossa. Joitain MAO-B selektiivisiä inhibiittoreita, kuten pargyliiniä, käytetäänkin jo yhdessä lääkkeitä Levodopan kanssa estämään Parkinsonin tautiin liittyvää liiallista dopamiinin hajotusta aivoissa. Näin ollen uusien, tehokkaiden ja turvallisten MAO-B selektiivisten inhibiittorien löytäminen on hyvin tärkeä aihe lääkeainetutkimuksessa. Tämän työn tarkoituksena oli tutkia 23 uutta MAO-B selektiivistä inhibiittoria ja niiden sitoutumis- ja inhibitiotehokkuutta MAO-B:n sitoutumistaskussa. Tutkimus toteutettiin sekä tietokoneella tehdyllä telakointisimulaatiolla että laboratoriossa suoritettulla fosfataasiaktiivisuusmittauksella. Tulokset osoittivat, että testimolekyylien inhibitiotehokkuus ei ollut samalla tasolla kaupallisen pargyliini-inhibiittorin kanssa. Telakointien ja fosfataasiaktiivisuusmittausten tulokset kuitenkin auttavat edistämään tulevaisuudessa tehtävien jatkotutkimusten menetelmien suunnittelua ja toteuttamista. Tulokset auttavat myös valitsemaan erilaisia inhibiittoreita tuleviin jatkotutkimuksiin.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Mathematics and Science

Department of Biological and Environmental Science

Cellular and Molecular Biology

Roivas, P. & Salmikangas, S.: Utilization of new monoamine oxidase B selective inhibitors in drug research

Bachelor of Science Thesis: 31 pages

Supervisors: Ph.D. Ulla Pentikäinen, Ph.D. Tatu Haataja,
Ph.D Pekka Postila

May 2018

Key Words: Binding site, docking, drug research, inhibitor, MAO-B, monoamine oxidase, phosphatase activity assay.

ABSTRACT

Monoamine oxidase (MAO) is an enzyme that is expressed in two different isoforms (MAO-A and MAO-B) on the outer membranes of mitochondria. MAOs catalyse the oxidative deamination of monoamines such as dopamine, serotonin and adrenaline. The excessive activity of MAOs in nerve cells cause Parkinson's- and Alzheimer's diseases, dementia, depression and many other neurological disorders. MAO-B is predominantly expressed in nerve cells, but MAO-A is expressed also in the internal organs. This makes MAO-B selective inhibitors great drugs for the treatment of a variety of different neurological disorders and diseases. Some MAO-B selective inhibitors, such as pargyline, are already being used alongside the drug Levodopa to prevent the Parkinson's disease associated excessive deamination of dopamine in the brain. This means that discovering new, effective and safe MAO-B selective inhibitors is an important subject in drug research. The aim of this study was to test the binding efficiency and inhibition efficiency of 23 new MAO-B selective inhibitors inside the binding site of MAO-B. The study was carried out by a docking simulation using computer software, and also in practice in the form of a phosphatase activity assay in the laboratory. The results showed that the inhibition efficiency of the test molecules were not on par with the commercial pargyline inhibitor. However, the results of the docking simulations and phosphatase activity assays do help in planning and executing future studies on the subject. The results also help in choosing different kinds of inhibitors for the future studies.

Sisältö

LYHENTEET	5
1. Johdanto	6
1.1 Monoamiinioksidaasit A ja B	6
1.2 MAO-B inhibiittorien käyttö lääkeaineina	7
1.3 MAO-B:n rakenne ja toiminta	7
1.4 Tietokoneavusteinen lääkeainesuunnittelu ja telakointiohjelmat	9
2. Materiaalit ja menetelmät	11
2.1 Käytetyt inhibiittorit	11
2.2 Telakointiohjelmien asetukset ja telakoinnin suoritus	16
2.3 Fosfataasiaktiivisuusmittausten materiaalit ja niiden tehtävät reaktioissa	17
3. Tulokset	20
3.1 Tietokonesimulaatioiden tulokset	20
3.2 Fosfataasiaktiivisuusmittausten tulokset	20
4. Tulosten tarkastelu	24
4.1 Telakoinnin tulosten tarkastelu	24
4.2 Fosfataasiaktiivisuustestien tulosten tarkastelu	27
4.3 Simulaatioiden ja laboratoriokokeiden tulosten vertailu	28
4.4 Jatkotutkimushaasteet	28
KIITOKSET	29
LÄHTEET	30

LYHENTEET

MAO-A	Monoamiinioksidaasi A
MAO-B	Monoamiinioksidaasi B
FAD	Flaviiniadeniinidinukleotidi
DMSO	Dimetyylisulfoksidi
HRP	Piparjuuriperoksidaasi (Horseradish Peroxidase)
PLANTS	Protein-Ligand ANT System
MM-GBSA	Molecular Mechanics Generalized Born Surface Area
OPLS	Optimized Potentials for Liquid Simulations

1. JOHDANTO

Lääkeaineina käytettävien inhibiittoreiden toiminta perustuu entsyymien katalyyttisen vaikutuksen estämiseen tai hidastamiseen (Cornish-Bowden, 2013). Inhibitio voi olla kompetitiivista, nonkompetitiivista tai unkompetitiivista. Kompetitiivisessa inhibitiossa inhibiittori matkii oikeaa substraattia ja kilpailee substraatin kanssa sitoutumisesta entsyymin aktiiviseen alueeseen. Nonkompetitiivisessa ja unkompetitiivisessa inhibitiossa inhibiittori sitoutuu johonkin toiseen osaan entsyymiä, ja estää substraatin sitoutumisen entsyymin aktiiviselle alueelle esimerkiksi muuttamalla entsyymin muotoa (Cornish-Bowden, 2013). Tässä työssä tutkimme uudenlaisia ihmisen monoamiinioksidaasi B:n (MAO-B) inhibiittoreita, jotka perustuvat kompetitiiviseen inhibitioon.

1.1 Monoamiinioksidaasit A ja B

Monoamiinioksidaasit (MAO) (EC 1.4.3.4) ovat mitokondrioiden ulkokalvoilla esiintyviä entsyymejä (Greenawalt & Schnaitman, 1970), jotka katalysoivat primääristen, sekundaaristen ja joidenkin tertiääristen monoamiinien oksidatiivista deaminaatiota (Edmondson ym., 2004). MAO-entsyymejä esiintyy lähinnä hermokudoksessa, kuten aivoissa ja selkäytimessä, jossa ne hajottavat ylimääräisiä neurotransmittereitä kuten dopamiinia, adrenaliinia ja serotoniinia. MAO:n löysi ensimmäisen kerran Mary Bernheim (o.s. Hare), joka nimesi entsyymin alun perin tyramiinioksidaasiksi (Hare, 1928). MAO-entsyymit voidaan jakaa A- ja B- alatyyppeihin (MAO-A ja MAO-B) niiden substraattien, inhibiittoreiden ja kudos- ja solujakauman perusteella (Johnston 1968, Knoll & Magyar 1972). MAO-A:n ja MAO-B:n välisiä eroja on esitelty taulukossa 1. Dimeerisen MAO-A:n molekulaarinen massa on noin 122 kDa ja dimeerisen MAO-B:n noin 120 kDa. Entsyymit ovat peräisin eri geneistä, ja niiden sekvenssit ovat noin 70% identtisiä (Bach ym., 1988).

Taulukko 1. MAO-A:n ja MAO-B:n väliset erot affiniteetissa substraatteihin ja inhibiittoreihin, sekä entsyymien esiintyvyys eri kudoksissa ja soluissa (Shih ym., 1999). Molempia entsyymejä löytyy hermosoluista, ja paikoitellen myös keskushermoston ulkopuolelta. Esiintyvyys vaihtelee myös lajien ja yksilöiden välillä.

	MAO-A	MAO-B
Substraatit	Dopamiini Adrenaliini Noradrenaliini Serotoniini	Dopamiini Adrenaliini Noradrenaliini β -fenyylietyyliamiini Bentsyyliamiini
Inhibiittorit	Klorgyliini Moclobemiidi Befloksatoni	Selegiliini Rasagiliini
Kudosjakauma	Eniten aivoissa, mutta löytyy myös maksasta, suolesta ja istukasta. Aivoissa suurin konsentraatio sinitumakkeessa (locus caeruleus).	Eniten aivoissa, mutta löytyy myös verihiiutaleista. Aivoissa suurin konsentraatio Raphe-tumakkeissa (raphe nuclei) ja gliasoluissa.
Solujakauma aivoissa	Katekoliaminergiset neuronit	Serotonergiset ja histaminergiset neuronit

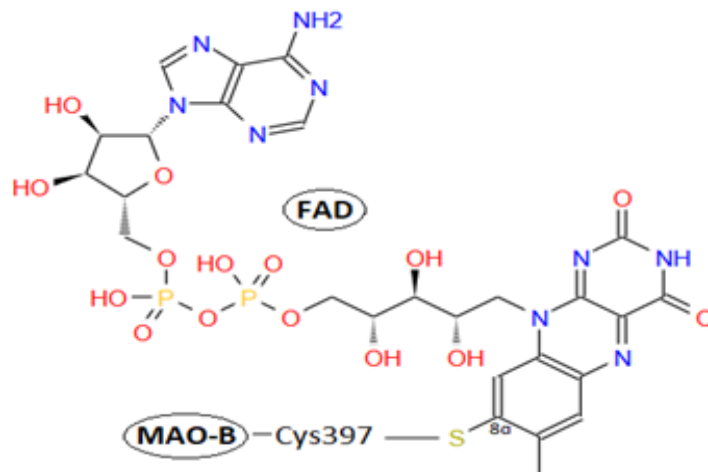
1.2 MAO-B inhibiittorien käyttö lääkeaineina

MAO-inhibiittoreilla on monia potentiaalisia terapeuttisia kohteita, ja uusia sekä MAO-A spesifisiä-, MAO-B spesifisiä-, että molemmille alamuodoille toimivia inhibiittoreita on kehitelty jo vuosikymmeniä (Youdim ym., 2006). Ensimmäinen MAO:n inhibitioon perustuva masennuslääke, iproniatsidi, johti muiden hydratsiinijohdannaisien kehittelyyn masennuslääkkeiksi. Myöhemmin kuitenkin havaittiin, että hydratsiinit aiheuttavat muun muassa maksavaurioita, korkeaa verenpainetta ja verenvuotoja, ja suurin osa niistä vedettiin pois markkinoilta. Tämän jälkeen kehitettiin hydratsiinivapaita MAO-inhibiittoreita, kuten pargyliini ja tranylylisyproamiini, jotka eivät olleet maksalle myrkyllisiä, mutta korkean verenpaineen aiheuttamat ongelmat pysyivät. Maksassa ja ohutsuolessa olevien MAO-entsyymien palautumaton inhiboituminen vapauttaa tyramiinia ja muita katekoliamiineja verenkiertoon, jolloin adrenergiset neuronit vapauttavat noradrenaliinia, joka aiheuttaa jopa hengenvaarallista verenpaineen nousua. MAO-B selektiiviset inhibiittorit eivät aiheuta tällaisia reaktioita, sillä sisäelimissä on hyvin vähän MAO-B:tä ja sisäelinten MAO-A hajottaa vapautuneen tyramiinin tehokkaasti (Youdim ym., 2005).

Selektiivisiä MAO-B inhibiittoreita käytetään nykyään lähinnä Parkinsonin taudin alkuvaiheen hoidossa yhdessä lääkeaine Levodopan kanssa estämään dopamiinin liiallista hajotusta neuroneissa (Carradori & Silvestri, 2015). Selektiivisten MAO-B inhibiittoreiden neuroneita suojelevan vaikutuksen vuoksi niitä on tutkittu myös vaihtoehtona Alzheimerin taudin hoidossa. MAO-B inhibiittoreita, joilla on positiivinen vaikutus kognitiivisiin ja affektiivisiin toimintoihin, on tutkittu myös yhdistelmä lääkkeenä sekä Parkinsonin että Alzheimerin taudin hoidossa (Krishna ym., 2014). MAO-B:n aktiivisuudella ja dopamiinin liiallisella hajotuksella on huomattu yhteyksiä myös esimerkiksi alkoholismiin, masennuksen, skitsofrenian, syömishäiriöiden, migreenien ja dementian kanssa (Carradori & Silvestri, 2015). Näin ollen turvallisten ja selektiivisten MAO-B inhibiittorien tutkiminen lääkeaineina on hyvin houkutteleva ja tärkeä aihe lääkeainetutkimuksessa.

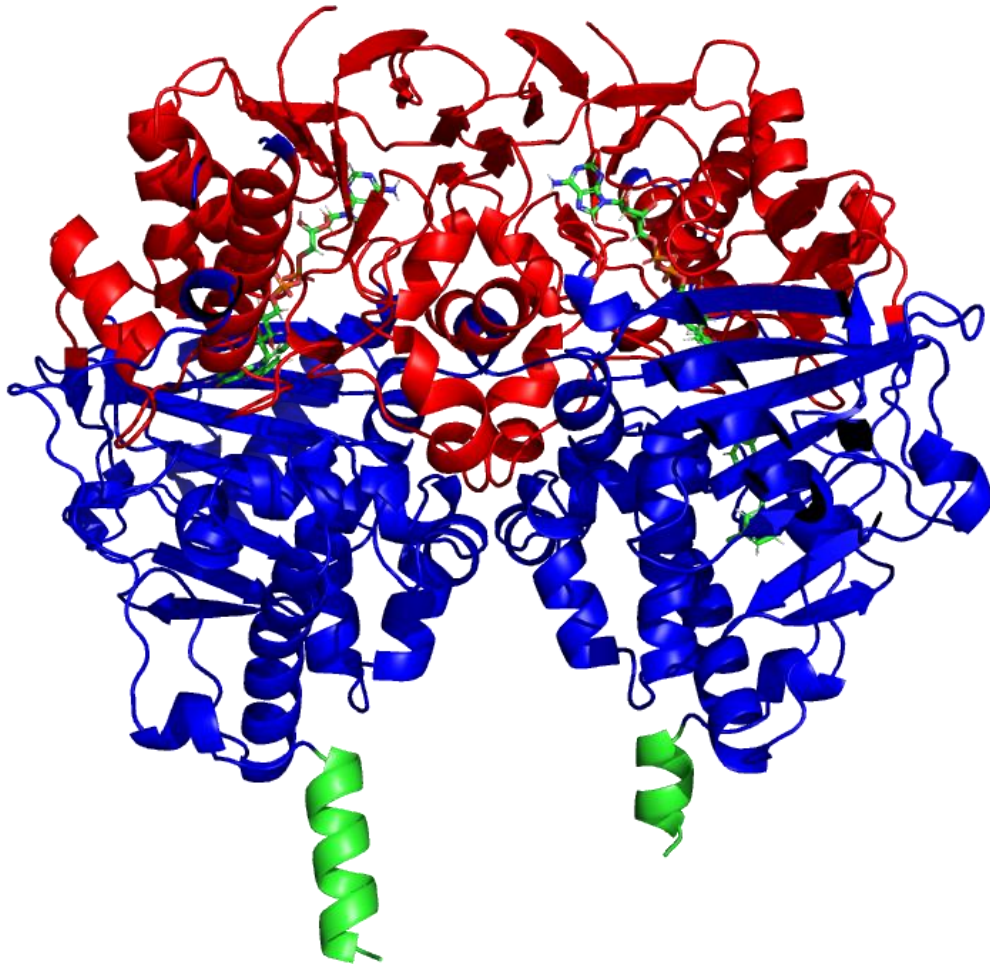
1.3 MAO-B:n rakenne ja toiminta

MAO-B vaatii flaviiniadeniinidinukleotidi (FAD) -kofaktorin toimiakseen. FAD on sitoutunut entsyymiin kovalenttisella tioetterisidoksella FAD:n isoalloksatsiinirenkaan 8α -metyleenin ja entsyymin Cys397 -tähteen välillä (Kearney ym., 1971) (kuva 1). FAD on ulkopinnaltaan hyvin hydrofiilinen. FAD:n sitoutumistasku entsyymiin sisällä on hyvin konservoitunut MAO:n alamuotojen ja eri lajien MAO-entsyymien välillä.



Kuva 1. FAD:n sitoutuminen MAO-B:hen. FAD sitoutuu isoalloksatsiinirenkaansa 8α -metyleenistä tioetterisidoksella MAO-B:n Cys397 aminohappotähteeseen.

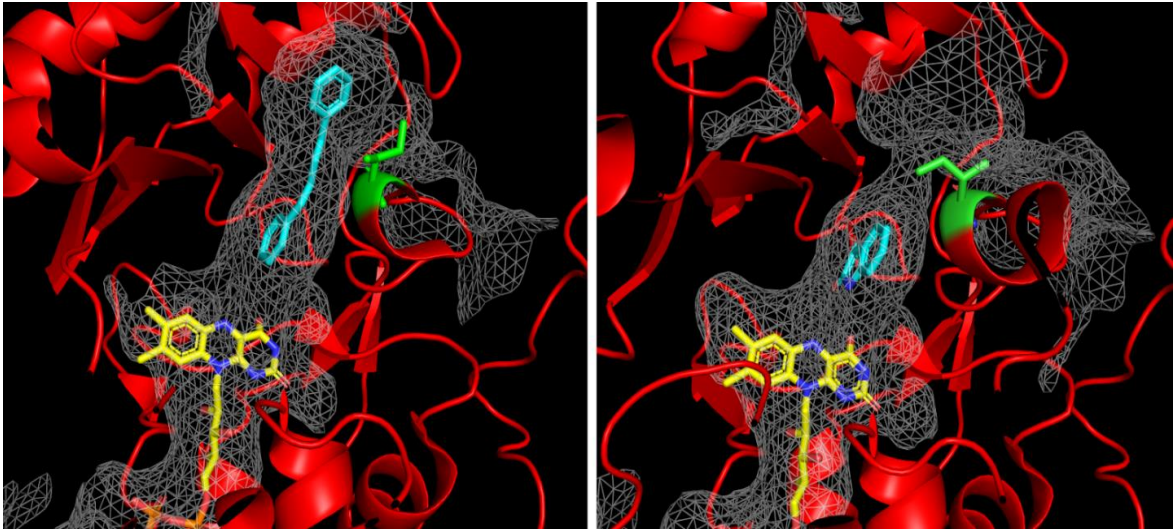
Kiderakenteessaan MAO-B:n on dimeerinen entsyymi. Dimerisoitumiseen tarvitaan merkittävän suuri vuorovaikutuspinta, jopa 15 % monomeerien pinnasta (Binda ym., 2003). Myös natiivissa tilassaan mitokondrion ulkokalvolla MAO-B on dimeerinen entsyymi (Binda ym., 2011), mutta monomeerien aktiiviset alueet toimivat kuitenkin itsenäisesti (Binda ym., 2004). MAO-B:n yhteensä 520 aminohaposta tähteet 1-488 ovat kalvorakenteen ulkopuolella, ja C-terminuksen tähteet 489-520 muodostavat hydrofobisen α -kierteen, joka ankkuroi entsyymien mitokondrion ulkokalvoon (kuva 2). Ulkopuolella olevasta osasta voidaan eritellä FAD:n sitoutumistasku (tähteet 4-79, 211-285, 391-453) ja substraatin sitoutumistasku eli entsyymien aktiivinen alue (tähteet 80-210, 286-390, 454-488) (kuva 2).



Kuva 2. Ihmisen dimeerisen MAO-B:n rakenne. Kuvassa on esitetty FAD:n sitoutumisalueet (tähteet 4-79, 211-285 ja 391-453) punaisella, substraatin sitoutumisalueet (tähteet 80-210, 286-390 ja 454-488) sinisellä ja membraaniin sitoutuva C-terminaalinen alue (tähteet 489-520) vihreällä. FAD-kofaktorit ovat esitettyinä tikkumalleina, joissa hiilet on väritetty vihreällä, typhet sinisellä, hapet punaisella ja fosforit oranssilla. Rakenteen resoluutio on 1.7 Å. PDB ID: 1OJA.

MAO-B:ssä on substraattitaskun ja FAD:ia sitovan taskun lisäksi sisäänkäyntitasku, jonka läpi substraatin tai inhibiittorin tulee kulkea päästäkseen entsyymien aktiiviselle alueelle (Binda ym., 2001). Hydrofobisen substraattitaskun tilavuus on noin 420 Å³ ja sisäänkäyntitaskun tilavuus noin 290 Å³. Substraattitasku ja sisäänkäyntitasku voivat olla joko yhteydessä toisiinsa tai kahtena eri taskuna, riippuen siitä, minkälainen substraatti tai inhibiittori aktiiviselle alueelle on sitoutuneena (Binda ym., 2003). Entsyymien aktiivisella alueella olevan Ile199-sivuketjun konformaatio voi olla joko avoimessa tai suljetussa tilassa, ja voi konformaatiostaan riippuen pitää taskujen välisen portin auki tai kiinni (kuva 3).

Ile199-sivuketju on suljetussa konformaatioissaan, kun aktiiviselle alueelle on sitoutuneena pargyliini, isatiini tai trans-2-fenyylysklopropyyliamiini, ja avoimessa konformaatioissaan, kun aktiiviselle alueelle on sitoutuneena 1,4-difenyyli-2-buteeni tai N-(2-aminoetyyli)-p-klorobentsamidi.



Kuva 3. MAO-B:n substraatin sitoutumistasku ja sisäänkäyntitasku. Kuvissa aminohappotähte Ile199 on väritetty vihreällä, sitoutunut inhibiittori (vasemmalla 1,4-Difenyyli-2-buteeni, oikealla isatiini) vaaleansinisellä, FAD-kofaktori keltaisella ja MAO-B:n sekundäärirakenne punaisella. Taskujen muoto näkyy kuvassa harmaana verkkona. Vasemmalla olevassa kuvassa taskujen välinen portti on auki, ja oikealla olevassa kuvassa portti on kiinni. Vasemmalla olevan rakenteen resoluutio on 2.3 Å ja oikealla olevan rakenteen resoluutio on 1.7 Å. PDB IDt: 1OJ9 (vasen) ja 1OJA (oikea).

Ile199-sivuketju on hyvin konservoitunut eri lajien MAO-B entsyymien välillä, kun taas MAO-A:n tapauksessa analogisessa kohdassa on hyvin konservoitunut fenyylialaniini (Hubalek ym., 2005). Hubalek ym. osoittivat tutkimuksessaan, että Ile199-sivuketju on yksi määrittävistä tekijöistä MAO-B:n inhibiittoreiden selektiivisyydessä. Näiden tietojen valossa MAO-B:n aktiivisen alueen taskun muotoa muokkaavat inhibiittorit (induced fit - inhibitors) ovat hyvin tärkeitä etsittäessä selektiivisiä MAO-B inhibiittoreita.

1.4 Tietokoneavusteinen lääkeainesuunnittelu ja telakointiohjelmat

Tietokoneiden laskennallinen tehokkuus on noussut lähes eksponentiaalisesti joka vuosi viime vuosikymmenten aikana (Moore, 1998). Tämän myötä tietokoneavusteinen lääkesuunnittelu on lisääntynyt huomattavasti tekniikan kehittyessä, ja siitä on tullut halvempaa, nopeampaa ja todenmukaisempaa. Keskityimme tutkimuksessamme lääkeainesuunnittelun ensimmäisiin vaiheisiin, tietokonesimulaatioihin ja entsyymiaktiivisuusmittauksiin. Lääkeainetutkimuksessa tehtävät tietokonesimulaatiot voidaan jakaa kahteen eri osa-alueeseen: rakennepohjaiseen ja ligandipohjaiseen rakennesuunnitteluun (Daina ym., 2017). Rakennepohjaisessa suunnittelussa keskitytään molekyylien kolmiulotteiseen rakenteeseen, sitoutumistaskun kokoon ja muotoon sekä molekyylien telakoitumiseen. Ligandipohjainen suunnittelu taas keskittyy ligandien kemiallisiin ominaisuuksiin ja niiden mahdollisuuksiin luoda vuorovaikutuksia sitoutumistaskun kanssa. Näiden kahden perusmenetelmän pohjalta on kehitetty monia erilaisia tapoja suunnitella lääkeaineita tietokoneella (Daina ym., 2017).

Tällä hetkellä lääkeainemolekyylien ominaisuuksien täydellinen ennustaminen on kuitenkin vielä haasteellista, ja molekyylien sitoutumisaffiniteetteja proteiineihin on vaikeaa ennustaa. Tällöin niiden simuloimiseen tietokoneella tarvitaan vielä

tarkempia matemaattisia malleja (Faver ym., 2013). Tämä on kuitenkin innostanut tutkijoita kehittämään yhä tarkempia tietokonemallinnuksia ja sovelluksia lääkeaineiden tutkimisen kehittämiseksi. Yksi esimerkki on tietokoneelle asennettava ligandien sitoutumista proteiineihin simuloiva telakointiohjelma.

Ligandien telakoinnissa tietokoneohjelma pyrkii löytää ligandille parhaan mahdollisen konformaation proteiinin sitoutumistaskun sisältä. Telakointiohjelmat antavat tuloksen telakoinnin onnistumisesta ja sitoutumistehokkuudesta yleensä ohjelman oman pistelaskujärjestelmän mukaisesti. Pisteidenlaskujärjestelmät ottavat yleensä huomioon esimerkiksi muodostuvat vetysidokset, vapaan energian muutoksen, molekyylien päällekkäisyydet ja atomien väliset heikot vuorovaikutukset. Käytimme tutkimuksessamme molekyylien telakoimiseen kahta erilaista telakointiohjelmaa. Toinen ohjelmista oli PLANTS (Protein-Ligand ANT System), joka pystyy ennustamaan pienten molekyylien telakoitumista proteiineihin. PLANTS:issa käytettävät algoritmit toimivat stokastisella optimoinnilla, joka yrittää saada molekyylille mahdollisimman pienen telakoitumisenergian ja saada sen mahtumaan sitoutumistaskuun mahdollisimman hyvin (Korb ym., 2006).

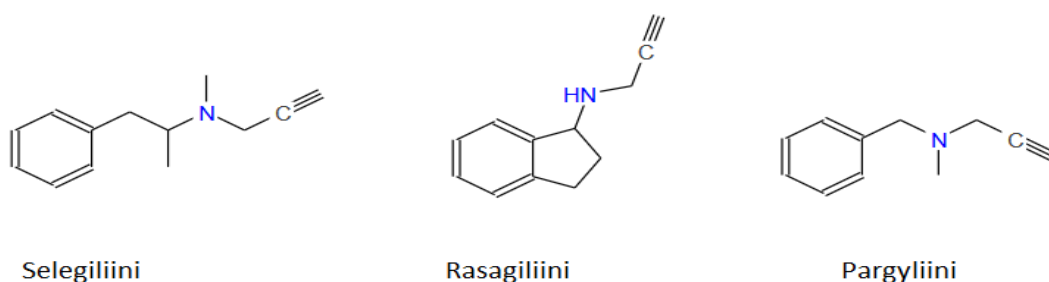
Toinen käytetyistä ohjelmista oli Schrödingerin Maestro-telakointiohjelma. Maestron sisällä käytettiin kahta eri simulaatiota: Glide ja MM-GBSA. Glide käyttää telakoinnissa hierarkkisessa järjestyksessä olevia filttareita, joiden avulla se yrittää löytää ligandille mahdollisimman hyvän asennon sitoutumistaskun sisältä (Tubert-Brohman ym., 2013). Tämän menetelmän avulla ohjelma päättää mitkä molekyylit eivät ole tarpeeksi hyviä sitoutumaan, minkä jälkeen on helppo karsia huonot molekyylit pois ja keskittyä hyvin sitoutuvien molekyylien tarkemman sitoutumisen määrittämiseen. MM-GBSA (Molecular Mechanics Generalized Born Surface Area) -ohjelma käyttää monia erilaisia mekanismeja taskun koon, polarisaation ja sitoutumisaffiniteetin ennustamiseen (Vijayakumar ym., 2014). Sekä PLANTS- että Maestro-ohjelmissa käytetään rakennepohjaista rakennesuunnittelua.

2. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

2.1 Käytetyt inhibiittorit

Työssä käytettiin inhibiittoreina 23 erilaista molekyyliä, jotka tilattiin SPECS:iltä (Bleiswijkseweg 55, 2712 PB Zoetermeer, Alankomaat). Jokainen molekyyli numeroitiin alla olevan taulukon mukaan (taulukko 2), jotta molekyylien merkitseminen olisi helpompaa. Molekyyleissä on sekä eroja että samankaltaisuuksia jo ennestään MAO-B inhibiittoreina käytettyjen molekyylien kanssa.

Työssä käytimme positiivisen kontrollin saamiseksi inhibiittorina pargyliiniä (kuva 4), joka on hyvin samankaltainen myös MAO-B:n inhibointiin käytettävien lääkkeiden, selegiliinin ja rasagiliinin, kanssa (Behari & Singhal, 2011). Pargyliini, selegiliini ja rasagiliini ovat yksinkertaisia molekyyliä, jotka sisältävät bentseenirenkaan, yhden typpiätomia ja yhden kolmoissidoksen. Toimiviksi todettuja inhibiittoreita ovat myös molekyylit, jotka sisältävät kalkoneita, pyrasoliineja, kromoneita, kumariineja, ksantiineja, isatiineja, thiatsolidinedioneita, (thiatsol-2-yl)hydratsoneja ja erilaisia variaatioita näistä yhdisteistä (Carradoni & Silvestri, 2015). Näistä pyrasoliineja ja kumariineja esiintyy joissain omista testimolekyyleistämme.

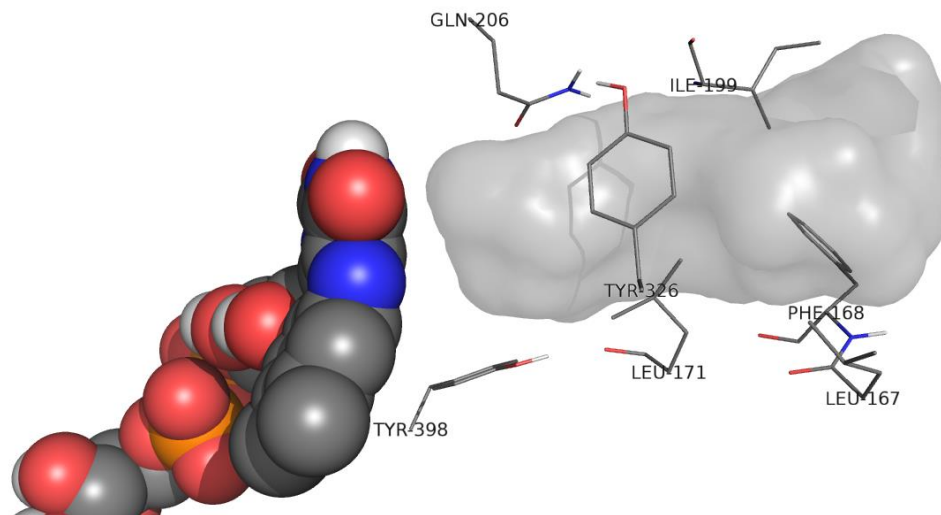


Kuva 4. Selegiliini, rasagiliini ja pargyliini. Kolmen tunnetun MAO-B inhibiittorina käytetyn molekyylin rakennekaavat. Kaikki molekyylit sisältävät vain hiiltä, vetyä ja typpeä. Rakenteellisesti molekyylit sisältävät yhden bentseenirenkaan ja yhden kolmoissidoksen.

Taulukko 2. Testimolekyyliden tunnistukset ja numerointi. Tutkimuksessa käytettyjen molekyyliden lyhenteet, molekyylipaino, numerointi ja SPECS koodit. Tiedot saatiin valmistajalta (SPECS).

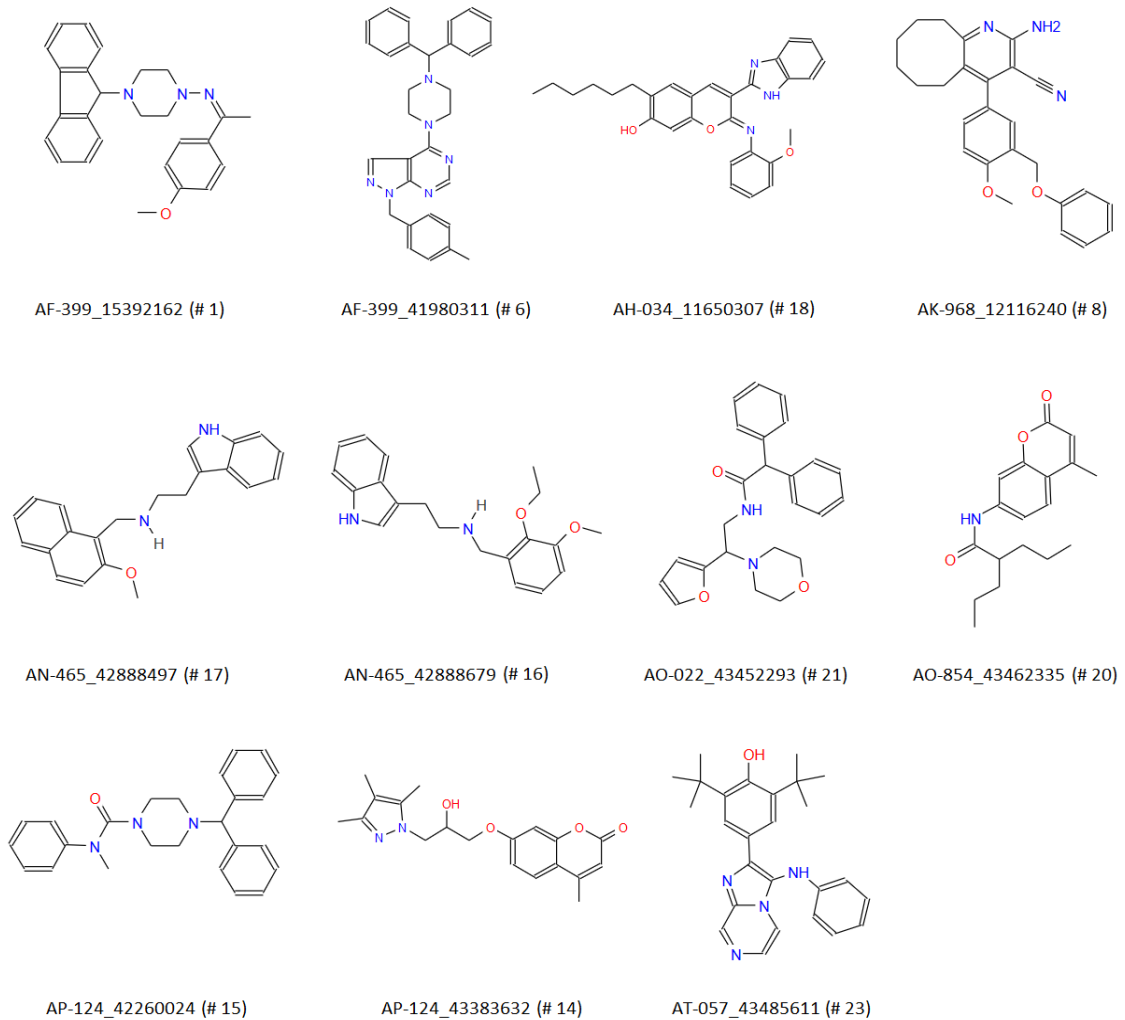
Lyhenteet	Molekyylipaino (g/mol)	Molekyylinumero	SPECS koodit
AF-399c	397,52	1	AF-399_15392162
AG-670	422,62	2	AG-670_40829115
AJ-292a	318,4	3	AJ-292_41694300
AJ-292b	510,08	4	AJ-292_15367103
AK-968d	436,31	5	AK-968_41926269
AF-399b	474,61	6	AF-399_41980311
AN-465a	466,42	7	AN-465_42162700
AK-968c	413,52	8	AK-968_12116240
AK-968a	310,39	9	AK-968_13408104
AF-399a	392,56	10	AF-399_15128636
AP-263	362,88	11	AP-263_43241430
AM-807	434,59	12	AM-807_41062471
AK-968b	399,49	13	AK-968_40730088
AP-124a	342,39	14	AP-124_43383632
AP-124b	385,51	15	AP-124_42260024
AN-465c	324,42	16	AN-465_42888679
AN-465b	330,43	17	AN-465_42888497
AH-034	467,57	18	AH-034_11650307
AO-022a	409,31	19	AO-022_43389587
AO-854	301,38	20	AO-854_43462335
AO-022b	390,48	21	AO-022_43452293
AG-690	310,4	22	AG-690_40638461
AT-057	414,55	23	AT-057_43485611

Tässä työssä käytettyjä molekyyliä yhdistää niiden suuri koko ja molekyylipaino, joka vaihtelee 300-510 g/mol välillä. Molekyylit ovat suurempia kuin nykyiset käytössä olevat inhibiittorit, kuten selegiliini ja rasagiliini, jotka ovat pienempiä ja ovat moolimassaltaan vain noin 180 g/mol. Yleistä testimolekyylielle oli se, että ne olivat pitkän mallisia, jotta ne mahtuisivat hyvin saman malliseen sitoutumistaskuun (kuva 5). Sitoutumistaskun toisessa päässä oleva FAD ja toisessa päässä oleva isohko tyhjä tila ovat myös vaikuttaneet suunniteltujen molekyylien muotoon. Myös sitoutumistaskun reunoilla olevat vetysidoksia muodostavat aminohappotähteet, kuten Leu167, Phe168, Leu171, Ile199, Gln206, Tyr326 ja Tyr398, ovat mahdollisesti aiheuttaneet sen, että useiden testimolekyylien keskellä on elektronegatiivisia atomeja, jotka voivat muodostaa vetysidoksia.



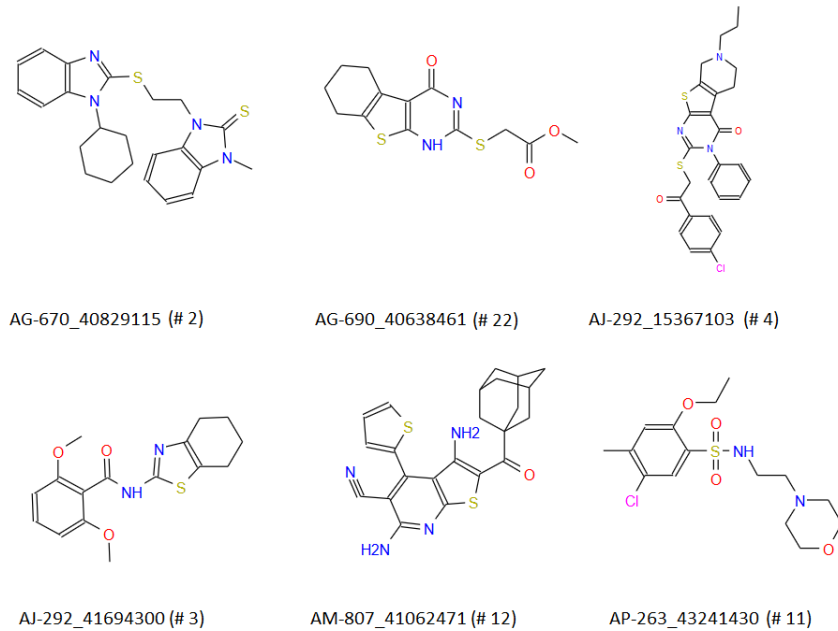
Kuva 5. Inhibiittorien sitoutumistasku MAO-B:ssä. Kuvassa sitoutumistasku on kuvattuna harmaalla, FAD-kofaktori pallomallina vasemmalla ja mahdollisia vetysidoksia muodostavat aminohappotähteet (Leu167, Phe168, Leu171, Ile199, Gln206, Tyr326 ja Tyr398) tikkumalleilla.

Suurin osa testimolekyyleistä sisältää hiilen ja vedyn lisäksi vain happea ja typpeä (kuva 6). Kaikissa molekyyleissä on myös monia bentseenirenkaita tai muita rengasrakenteita. Rengasrakenteet voivat pinoutua π -sidoksilla rengasrakenteita sisältäviin MAO-B:n aminohappotähteisiin, kuten Tyr326 ja Tyr435.



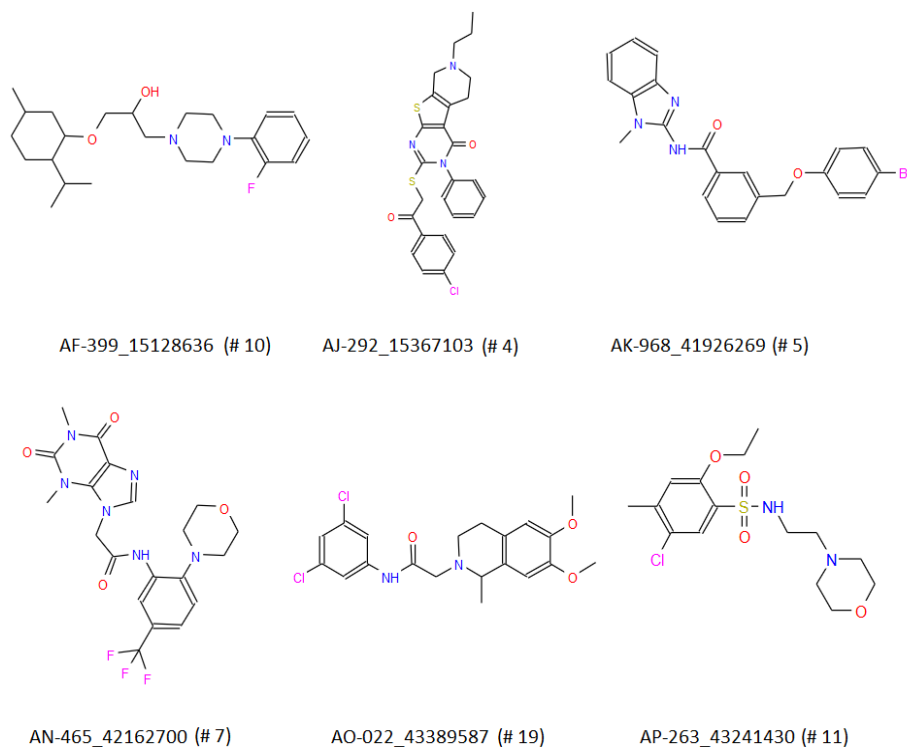
Kuva 6. Vain typpeä ja happea sisältävät molekyylit. Rakennekaavat tutkimuksissa käytetyille molekyyleille, jotka sisältävät vain hiiltä, happea, typpeä ja vetyä (molekyylit 1, 6, 8, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21 ja 23).

Rikkijohdannaisissa molekyyleissä (kuva 7) oli tarkoitus muodostaa rikkisiltoja MAO-B:n rakenteessa olevien kysteiinien ja metioniinien kanssa. Rikkiä esiintyi kuudessa molekyylissä.

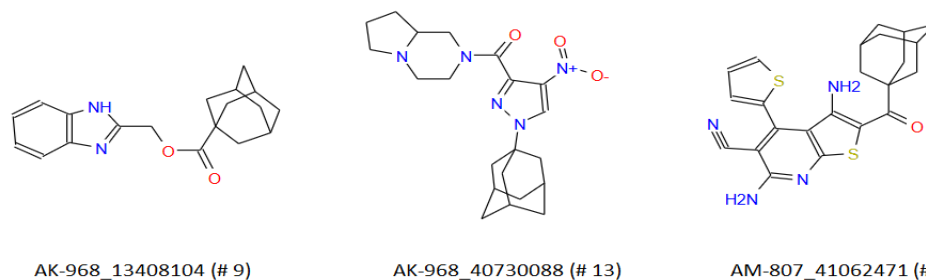


Kuva 7. Rikkijohdannaiset molekyylit. Rakennekaavat tutkimuksissa käytetyille molekyyleille, jotka sisältävät rikkiä (molekyylit 2, 3, 4, 11, 12 ja 22).

Kuudessa molekyylissä käytettiin halogeenejä (kuva 8) ja kolmessa käytettiin kymmenestä hiilestä muodostuvaa häkkirakennetta (kuva 9). Halogeenien ja häkkirakenteiden tarkoitus oli täyttää sitoutumistaskun FAD:n puolella tai FAD:n vastaisella puolella oleva tila tehokkaasti, jolloin molekyyli asettuisi ja sitoutuisi taskuun paremmin.



Kuva 8. Halogeenijohdannaiset molekyylit. Rakennekaavat tutkimuksissa käytetyille molekyyleille, jotka sisältävät fluoria, bromia tai klooria (molekyylit 4, 5, 7, 10, 11 ja 19).



Kuva 9. Häkkirakenteita sisältävät molekyylit. Rakennekaavat tutkimuksissa käytetyille molekyyleille, jotka sisältävät hiilestä muodostetun häkkirakenteen (molekyylit 9, 12 ja 13).

Monissa molekyyleissä esiintyy sekaisin rikkiä, halogeeneja ja häkkirakenteita. Molekyyliden erilaisten rakenteiden yhdistäminen voi antaa tarkempaa dataa siitä, mitä molekyylin tarvitsee sisältää ollakseen mahdollisimman tehokas inhibiittori MAO-B:lle. Tämän jälkeen parhaita molekyylejä voidaan jalostaa jatkotutkimuksiin.

2.2 Telakointiohjelmien asetukset ja telakoinnin suoritus

Testimolekyylit telakoitiin MAO-B:hen sekä PLANTS:illa että Maestron Glidellä ja MM-GBSA:lla. Tietokonesimulaatioissa MAO-B:n rakenteena käytettiin Protein Data Bankista (PDB) haettua MAO-B:n röntgensädekristallografian avulla määritettyä kolmiulotteista kiderakennetta (PDB ID: 2V60), ja kyseisestä rakenteesta käytettiin pelkkää A-ketjua. Rakenteen resoluutio on 2.0 Å. Tämä rakenne sisältää MAO-B entsyymien, johon on sitoutuneena selektiivisenä inhibiittorina 7-(3-klorobentsyylioksi)-4-karboxialdehydikumariini. Kun tämä inhibiittori poistettiin molekyylitointiohjelmalla (PyMOL), jäi jäljelle sitoutumistasku, johon voitiin telakoida tutkittavia inhibiittoreita.

Telakoinnit suoritettiin alla olevan taulukon ohjeiden mukaisesti (taulukko 3). PLANTS:illa suoritettiin yksi, Maestron Glidellä kaksi ja Maestron MM-GBSA:lla kaksi telakointia. Sekä PLANTS:illa että Maestrolla telakoitaessa molekyylit käsiteltiin ensin ligprep-ohjelmalla, joka muuttaa molekyyliden 3D-rakenteet sellaiseen muotoon, jota telakointiohjelmat voivat käsitellä. Tämän jälkeen PLANTS-telakoinnissa poistettiin MAO-B:n rakenteesta vesimolekyylit ja lisättiin molekyyleihin vedyt Reduce-ohjelmalla. Toisessa Maestron Glide-telakoinnissa poistettiin vesimolekyylit 5 Å säteeltä heteroatomeista, ja toisessa telakoinnissa vesimolekyylit poistettiin koko rakenteesta. Kaikissa Maestrotelakoinneissa lisättiin Ile501-aminohappotähteen puuttuvat atomit ja minimoitiin vedyt molekyyleistä. Maestro-telakoinnissa optimoitiin myös sivuketjujen pKa-arvot PROPKA-ohjelmalla siten, että ne vastaavat parhaiten ihmiskehon olosuhteita pH:ssa 7.4. Tämän jälkeen molemmissa telakoinneissa luotiin koordinaatisto ja määritettiin sen keskipiste inhibiittoreiden keskipisteeksi. Kun keskipiste oli määritelty, oltiin valmiita aloittamaan PLANTS-telakointi. Maestro-telakoinnissa ensimmäiset kaksi telakointia tehtiin Glide-ohjelmalla käyttäen Extra Precision -asetusta sekä Optimized Potentials for Liquid Simulations 3 (OPLS3) -voimakenttää. Maestrolla tehtiin vielä kaksi telakointia käyttäen MM-GBSA-ohjelmaa, joissa käytettiin VSGB-energiamallia ja OPLS 8 -voimakenttää. Toisessa MM-GBSA-telakoinnissa proteiini oli staattinen, kun taas toisessa 4 Å sisällä sitoutumistaskusta olevien aminohappotähteen sallittiin liikkua induced fit -periaatteella. Loppujen lopuksi ajettiin siis yhteensä viisi simulaatiota, joista jokaisesta otettiin jokaiselle molekyylille 10 parhaan tuloksen saanutta konformaatiota talteen.

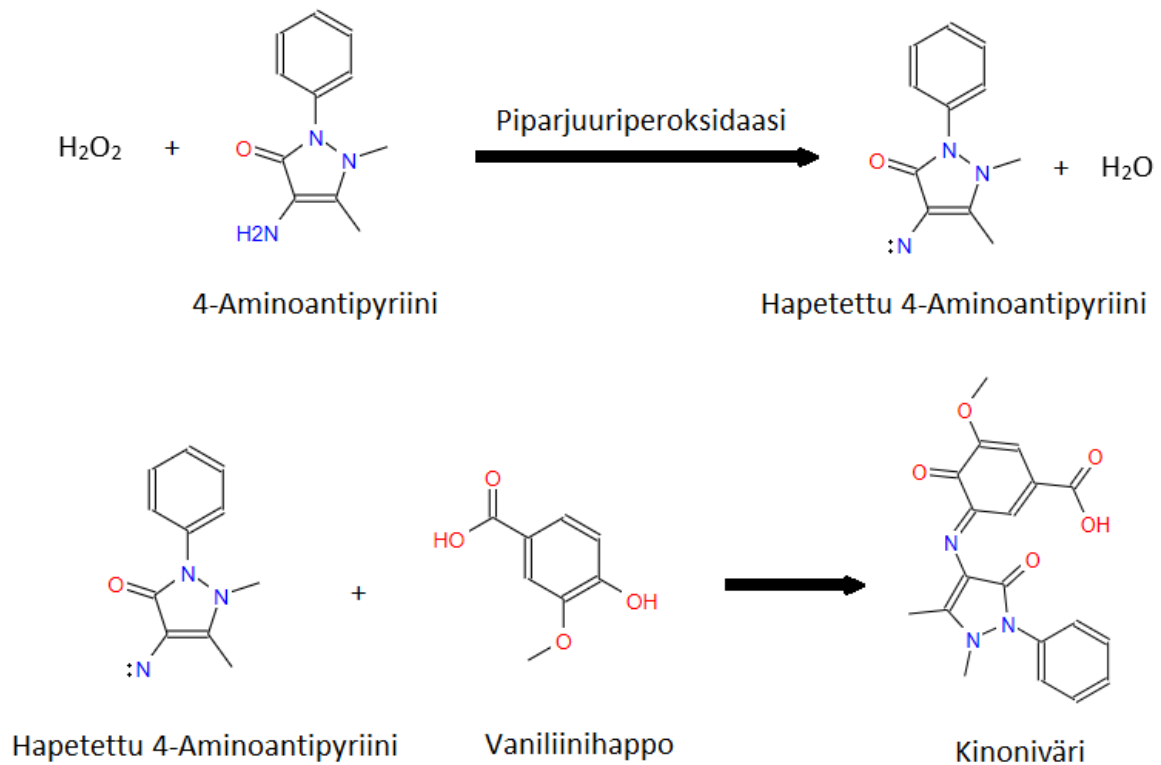
Taulukko 3. Molekyylien telakoinnin suoritus PLANTS:illa ja Maestrolla. Taulukossa on lueteltu vaihe vaiheelta telakoinnin suoritus PLANTS:illa, Glidellä ja MM-GBSA:lla. Käytetyt apuohjelmat ovat lihavoituna.

PLANTS v 1.2	Maestro v 11.3.016, Glide	Maestro v 11.3.016, MM-GBSA
1. Ligandin esikäsittely ligprep -ohjelmalla	1. Ligandin esikäsittely ligprep -ohjelmalla	1. Ligandin esikäsittely ligprep -ohjelmalla
2. Proteiinin esikäsittely: vetyjen lisäys Reduce -ohjelmalla (v 3.13.080428). Vesimolekyylit poistettu rakenteesta.	2. Proteiinin esikäsittely: Protein Preparation Wizardilla vedet 5 Å säteeltä päälle/pois, tehtiin molemmat; Ile501 sivuketjun puuttuvat atomit lisätty; vedyt minimoitu. Proteiinin sivuketjujen pKa-arvot optimoitu pH:ssa 7.4 PROPKA -ohjelmalla.	2. Proteiinin esikäsittely: Protein Preparation Wizardilla Ile501 sivuketjun puuttuvat atomit lisätty; vedyt minimoitu. Proteiinin sivuketjujen pKa-arvot optimoitu pH:ssa 7.4 PROPKA -ohjelmalla.
3. Koordinaatiston luonti, keskipisteen X Y Z - koordinaatit inhibiittorin keskipisteessä.	3. Koordinaatiston luonti, keskipisteen X Y Z - koordinaatit inhibiittorin keskipisteessä.	3. Koordinaatiston luonti, keskipisteen X Y Z - koordinaatit inhibiittorin keskipisteessä.
4. Telakointi 10 Å säteellä inhibiittorista	4. Extra precision telakointi Glidellä , OPLS 3 voimakenttä. Kaksi telakointia, toisessa vesimolekyylit poistettu 5 Å sisällä heteroatomeista, toisessa vesimolekyylit poistettu koko rakenteesta.	4. MM-GBSA :lla kaksi telakointia: VSGB energiamalli, OPLS8 voimakenttä. Toisessa telakoinnissa proteiinin joustavuus 0 Å säteellä inhibiittorista ja toisessa 4 Å säteellä inhibiittorista.

2.3 Fosfataasiaktiivisuusrajoitusten materiaalit ja niiden tehtävät reaktioissa

Molekyylien inhibiitotehokkuutta mitattiin kolorimetrisellä menetelmällä jatkuvan spektrofotometrisen mittauksen avulla. Jotta mittauslaite pystyisi havaitsemaan MAO-B:n aktiivisuudessa tapahtuvan muutoksen, on siinä tapahduttava laitteen havaitsema valonmäärän muutos tietyllä aallonpituudella (Holt ym., 1997). Normaalisti MAO-B katalysoi monoamiinien oksidatiivista deaminaatiota (Edmondson ym., 2004) ja tässä kokeessa MAO-B:n substraattina on tyramiini. Kun reaktioon lisätään kompetitiivinen inhibiittori, se estää tyramiinin oksidatiivisen deaminaation. Testeissä reaktioon on lisätty aromaattista vanilliinihappoa ja 4-aminoantipyriiniä, jotka yhdistyessään tuottavat 490nm valon aallonpituudella absorboivaa punaista kinoniväriä (Holt ym., 1996). Tämä kuitenkin tapahtuu vain, kun aromaattisia yhdisteitä hapettava piparjuuriperoksidaasi (HRP) hapettaa 4-aminoantipyriinin, joka sen jälkeen yhdistyy vanilliinihapon kanssa muodostaen kinoniväriä (kuva 10). Normaalisti toimiessaan MAO-B pilkkoo tyramiinin aminoryhmän pois, jolloin muodostuu vetyperoksidia. Kun mukaan laitetaan toimiva inhibiittori, joka sitoutuu MAO-B:hen, ei reaktiossa voi muodostua vetyperoksidia. HRP-entsyymi toimii vain vetyperoksidin läsnäollessa, joten MAO-B:n inhibitoituessa kinoniväriä ei muodostu.

Kinonivärin absorboiman 490nm aallonpituuden valon määrästä voidaan näin ollen päätellä kuinka hyvin MAO-B on inhiboitu (Holt ym., 1997).



Kuva 10. HRP-entsyymin katalysoima reaktio, jossa syntyy kinoniväriä. Kuvassa vetyperoksidi on peräisin MAO-B:n katalysoimasta tyramiinin oksidatiivisesta deaminaatiosta. Vetyperoksidin läsnäollessa HRP-entsyymi hapettaa 4-aminoantipyriniin. Hapetettu 4-aminoantipyrini ja vanilliinihappo muodostavat yhdessä punaista kinoniväriä, joka absorboi valoa 490nm aallonpituudella.

Testimolekyylit liuotettiin dimetyylisulfoksidiin (DMSO). Molekyylit liukenivat eri konsentraatioihin välille 1 - 40 mM, mutta molekyylit 3 ja 19 eivät lienneet edes 1 mM konsentraatioon. Myös näitä molekyylejä kuitenkin käytettiin mittauksissa, vaikka niiden tarkkaa konsentraatiota (< 1 mM) ei tiedetty. MAO-B:n inhibition mittaamista varten valmistettiin kromogeeni- ja substraattiliuokset. Kromogeeniliuos valmistettiin lisäämällä 1 mM vanilliinihappoa (Sigma, #H3, 600-1), 500 μM 4-aminoantipyriniä (Sigma, #A482-25G) ja 8 U/ml HRP:tä (400 U/l 26.10.2016 Elisa) 0.2 M K-fosfaattipuskuriin. Kromogeeniliuos pidettiin valolta suojattuna ja samaa liuosta käytettiin jokaisessa mittauksessa. Substraattiliuos valmistettiin lisäämällä 5 mM tyramiinia (Sigma, #T2879-5G) 0.2 M K-fosfaattipuskuriin. Uutta substraattiliuosta liuotettiin päivittäin, koska tyramiinin säilytysaika liuoksessa on yksi päivä. Mittausta varten molekyylit liuotettiin myöskin tarvittaviin konsentraatioihin.

Mittauksissa käytetystä MAO-B:stä (Sigma, #M7441-1VL) käytettiin kahta eri erää: uudempaa (lot. SLBN3533, 2018) ja vanhempaa (lot. SLBN1403v, 2016). Ennen varsinaisia inhibitiomittauksia molemmille MAO-B erille tehtiin aktiivisuustestit mittaamalla fosfataasiaktiivisuutta eri MAO-B:n konsentraatioilla. Ennen inhibitiomittauksia mitattiin myös eri reaktiokomponenttien tausta-absorbanssit. Positiivisena kontrollina mittauksissa käytettiin 10 nM pargyliiniä (Sigma, #P8013-1G), ja negatiivisena kontrollina inhiboimatonta reaktiota. Reaktion kaikki ainekset substraattia lukuun ottamatta lisättiin kuoppalevyille (nunc, 96F without lid SH) ja sekoitettiin

huolellisesti. Tämän jälkeen kuoppalevyä inkuboitiin 37 °C asteessa Victor 4x (PerkinElmer) -kuoppalevynlukijalla 30 minuutin ajan. Kuoppalevyllä olevien aineiden lopulliset konsentraatiot ovat esitettynä taulukossa 4. Inkubaation jälkeen spektrofotometrillä mitattiin reaktioiden tausta-absorbanssi 490 nm aallonpituudella, 13 mm mittauskorkeudella ja 1 s mittausajalla. Mittauksen jälkeen kuoppalevyllä lisättiin substraattiliuosta, jonka lopullinen konsentraatio kuoppalevyllä oli 1,25 mM. Tämän jälkeen kuoppalevyä mitattiin 490 nm aallonpituudella, 13 mm mittauskorkeudella ja 1 s mittausajalla tietyn ajan välein (15 s - 10 min) niin kauan, että reaktionopeus saatiin määritettyä eikä kuoppalevyllä enää havaittu fosfataasiaktiivisuuden muutoksia. Inhibitiomittauksia tehtiin kaksi kappaletta: toisessa mittauksessa 10 µM inhibiittorikonsentraatiolla, toisessa mittauksessa 50 µM inhibiittorikonsentraatiolla.

Taulukko 4. Kuoppalevyn kuopalla olevien reagenssien konsentraatiot reaktiossa. Reaktion lopputilavuus kuopalla oli 200 µl, ja reaktiot tapahtuivat 0,2 M K-fosfaattipuskurissa.

Reagenssi	Konsentraatio kuopalla
Vanilliinihappo	250 µM
4-aminoantipyriini	125 µM
HRP	2 U/ml
MAO-B	0,12 mg/ml
Tyramiini	1,25 mM
Testimolekyyli	10 µM tai 50 µM
Pargyliini (pos. kontrollissa)	10 nM

3. TULOKSET

3.1 Tietokonesimulaatioiden tulokset

Tietokoneella tehtyjen telakointien tuloksista jokaisen molekyylin 10 parhaasta konformaatiosta valittiin jokaiselle molekyyllille vain yksi paras konformaatio, ja tulokset kerättiin taulukkoon (taulukko 5). PLANTS-telakoinnissa molekyylit 10, 14 ja 17 saivat parhaat tulokset, kun taas molekyylit 15, 18 ja 23 saivat huonoimmat tulokset. Glide-telakoinneissa molekyylit 14, 17 ja 20 saivat parhaat tulokset, ja MM-GBSA-telakoinneissa molekyylit 9, 17, 19 ja 20 saivat parhaat tulokset. Maestrolla tehdyistä telakoinneista on vaikea erottaa huonoimpia tuloksia, sillä osa molekyyleistä ei läpäissyt kaikkia ligandin sitoutumisessa käytettäviä filttoreita. Tämän takia Maestron ohjelmat eivät saaneet osaa molekyyleistä telakoitua ollenkaan.

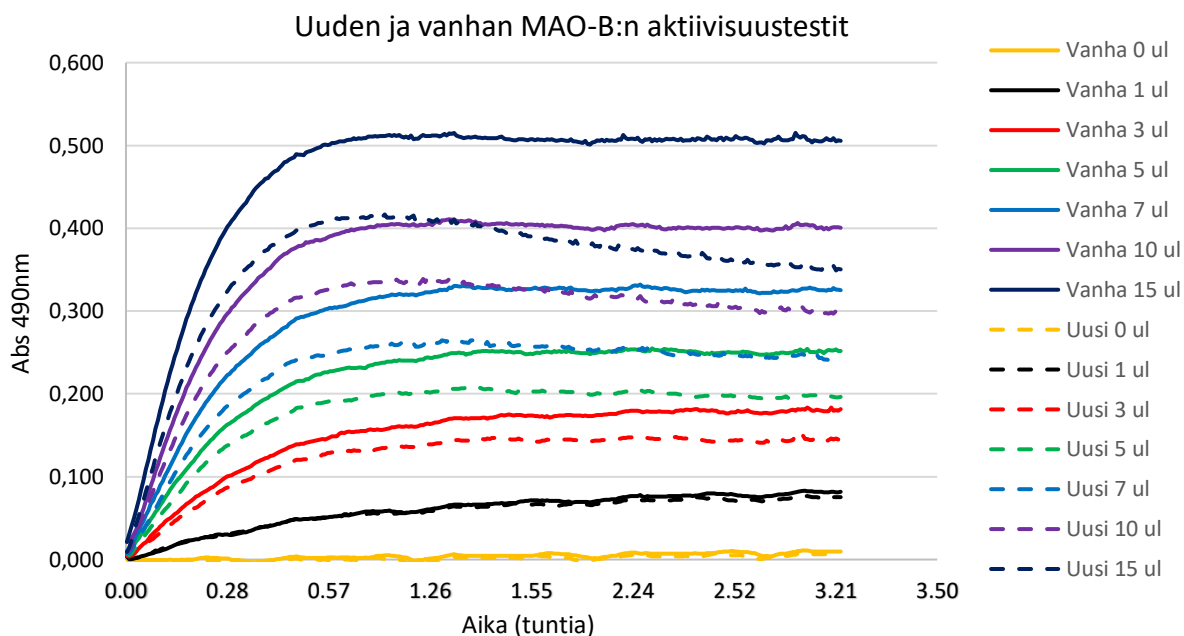
Taulukko 5. Molekyylien telakointien tulokset. Taulukossa molekyylit ovat lueteltuna numerojärjestyksessä, ja toisessa sarakkeessa on molekyylien SPECS-koodit. Kolmannessa sarakkeessa on PLANTS-telakoinnin tulokset, neljännessä ja viidennessä sarakkeessa Glide-telakointien tulokset, ja kuudennessa ja seitsemännessä sarakkeessa MM-GBSA-telakointien tulokset. Numerot ovat ohjelmien omien pistelaskujärjestelmien laskemia pisteitä. Mitä negatiivisempi numero on, sitä paremmin molekyyli on telakoitu. Merkki N/A tarkoittaa sitä, että Maestron ohjelmat eivät ole saaneet molekyyliä telakoitua ollenkaan.

Numero	SPECS-koodi	PLANTS telakointi	Glide telakointi, vesi-	Glide telakointi, vesi-	MM-GBSA telakointi,	MM-GBSA telakointi,
			molekyylit poistettu 5 Å säteellä heteroatomeista	molekyylit poistettu koko rakenteesta	0 Å proteiinin joustavuus	4 Å proteiinin joustavuus
1	AF-399_15392162	-90.4888	N/A	-5.171	N/A	N/A
2	AG-670_40829115	-97.4217	N/A	-0.203	N/A	N/A
3	AJ-292_41694300	-79.6631	-8.470	-8.674	-19.831	-56.290
4	AJ-292_15367103	-80.8684	N/A	N/A	N/A	N/A
5	AK-968_41926269	-99.0274	N/A	-3.995	N/A	N/A
6	AF-399_41980311	-76.5635	N/A	N/A	N/A	N/A
7	AN-465_42162700	-99.3156	N/A	-2.458	N/A	N/A
8	AK-968_12116240	-75.71	N/A	N/A	N/A	N/A
9	AK-968_13408104	-100.917	-7.597	-6.205	-48.610	-78.883
10	AF-399_15128636	-111.286	N/A	-5.043	N/A	N/A
11	AP-263_43241430	-88.6095	-6.819	-5.929	-4.753	-47.771
12	AM-807_41062471	-90.1676	N/A	-4.693	N/A	N/A
13	AK-968_40730088	-73.5317	N/A	-4.506	N/A	N/A
14	AP-124_43383632	-112.647	-9.865	-9.604	-13.236	-74.122
15	AP-124_42260024	-44.9249	N/A	-5.890	N/A	N/A
16	AN-465_42888679	-102.871	-7.893	-8.464	-17.684	-54.792
17	AN-465_42888497	-113.922	-9.417	-8.943	-20.877	-79.117
18	AH-034_11650307	-58.3673	N/A	N/A	N/A	N/A
19	AO-022_43389587	-90.1219	-4.090	-6.890	33.880	-66.230
20	AO-854_43462335	-93.6874	-10.585	-9.904	-35.001	-59.994
21	AO-022_43452293	-78.1826	N/A	-5.949	N/A	N/A
22	AG-690_40638461	-95.8212	-7.838	-7.642	-19.159	-59.063
23	AT-057_43485611	-51.6806	N/A	N/A	N/A	N/A

3.2 Fosfataasiaktiivisuustmittausten tulokset

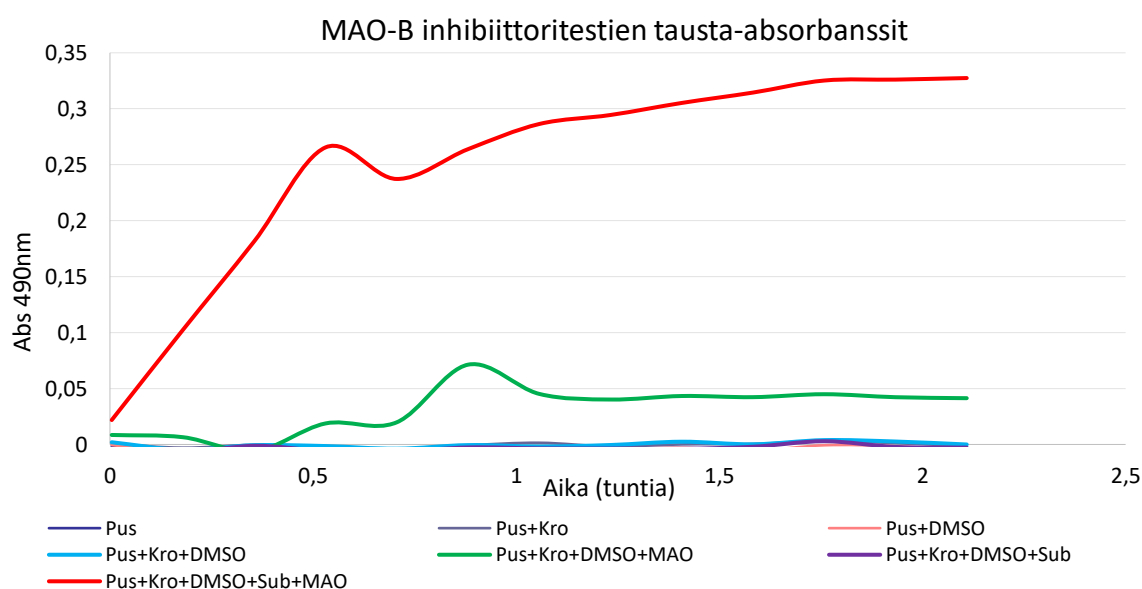
Spektrofotometrisistä mittauksista muodostettiin kuvaajat, joissa X-akselilla on aika ja Y-akselilla absorbanssi 490 nm aallonpituudella (kuvat 11-15). Absorbanssin määrä on suoraan verrannollinen MAO-B:n katalysoimassa reaktiossa muodostuneeseen vetyperoksidin määrään, eli MAO-B:n inhibitio on sitä vahvempi, mitä vähemmän absorbanssia havaitaan mittauksen aikana. Ensimmäisessä mittauksessa verrattiin uuden ja vanhan MAO-B erän aktiivisuutta ilman inhibiittoreita (kuva 11). Huomattiin, että molemmat MAO-B erät

toimivat hyvin, vaikka vanhempi MAO-B toimi tehokkaammin entsyyminä. Pienimmillä konsentraatioilla aktiivisuus ei eronnut paljoa uuden ja vanhan MAO-B:n välillä, mutta suurimmilla konsentraatioilla erottui, että vanhempi MAO-B on tehokkaampaa. Vanha MAO-B oli melkein yhtä aktiivinen 10 μ l konsentraatiolla kuin uusi oli 15 μ l konsentraatiolla.



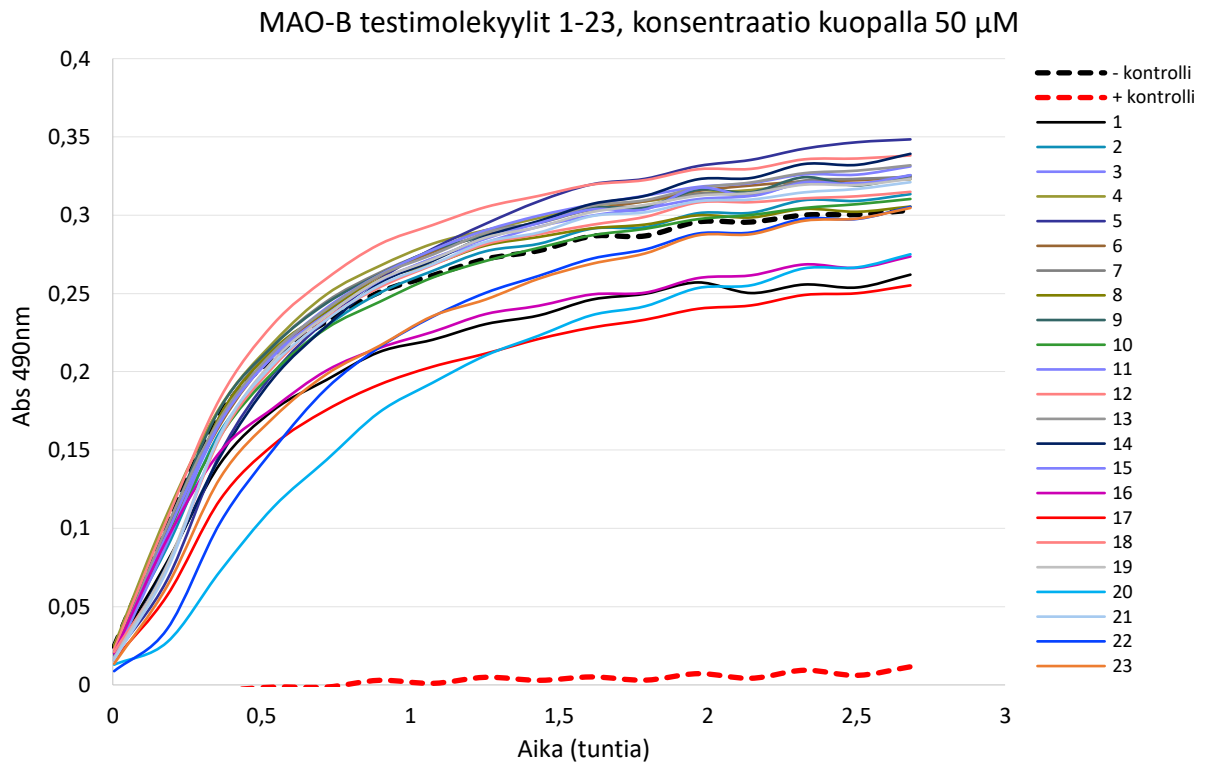
Kuva 11. Uuden ja Vanhan MAO-B erän vertailu. Kuvassa vanhan MAO-B:n aktiivisuus on esitettyä yhtenäisillä viivoilla, ja uuden MAO-B:n aktiivisuus katkoviivoilla. Samat värit kuvaavat entsyymien samaa konsentraatiota.

Toisessa mittauksessa selvitettiin, kuinka paljon reaktion eri reagenssit aiheuttivat mahdollista tausta-absorbanssia (kuva 12). Kromogeeniliuos, substraattiliuos ja DMSO eivät aiheuttaneet tausta-absorbanssia. MAO-B aiheutti hieman tausta-absorbanssia ilman substraattiakin, ja tämä otettiin huomioon inhibitiomittausten analysoinnissa.



Kuva 12. Mittauksissa käytettyjen reagenssien absorbanssit. Kuvaajassa on esitettyä punaisella viivalla inhiboimattoman reaktion absorbanssi ja vihreällä reaktion absorbanssi ilman substraattia. Muut reagenssit eivät aiheuttaneet tausta-absorbanssia.

Molekyylit testattiin tämän jälkeen myös 50 μM konsentraatiolla (kuva 15). Mittauksista huomattiin, että MAO-B:n inhibitiioon suunnitellut testimolekyylit eivät toimineet tarpeeksi tehokkaasti reaktion estämiseksi edes 50 μM konsentraatiolla.



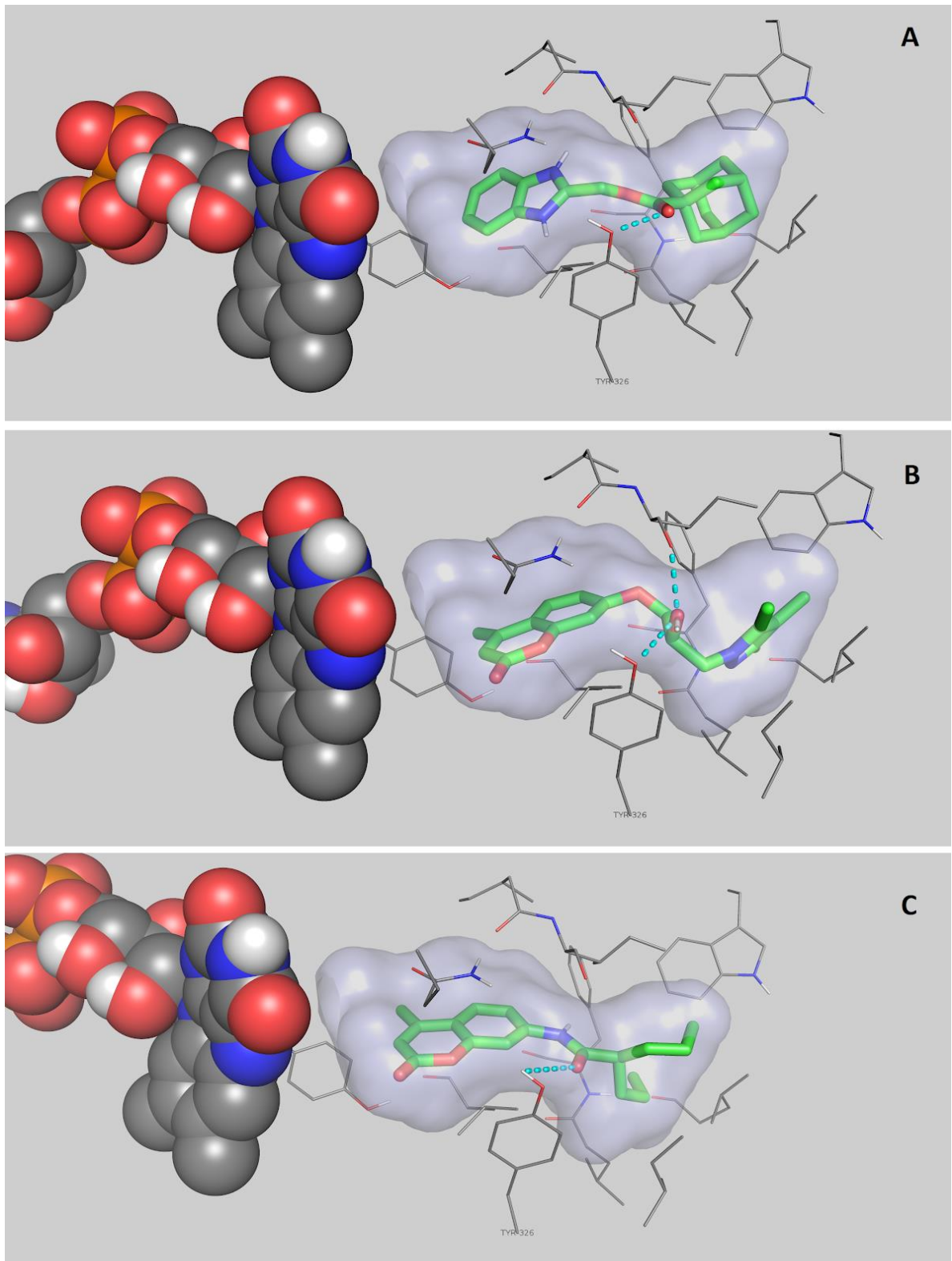
Kuva 15. Kaikkien testimolekyylien inhibiotehokkuus konsentraatiolla 50 μM . Kuvassa negatiivinen kontrolli (inhiboimaton reaktio) on esitettyä mustalla katkoviivalla ja positiivinen kontrolli (10 nM pargyliini) punaisella katkoviivalla.

4. TULOSTEN TARKASTELU

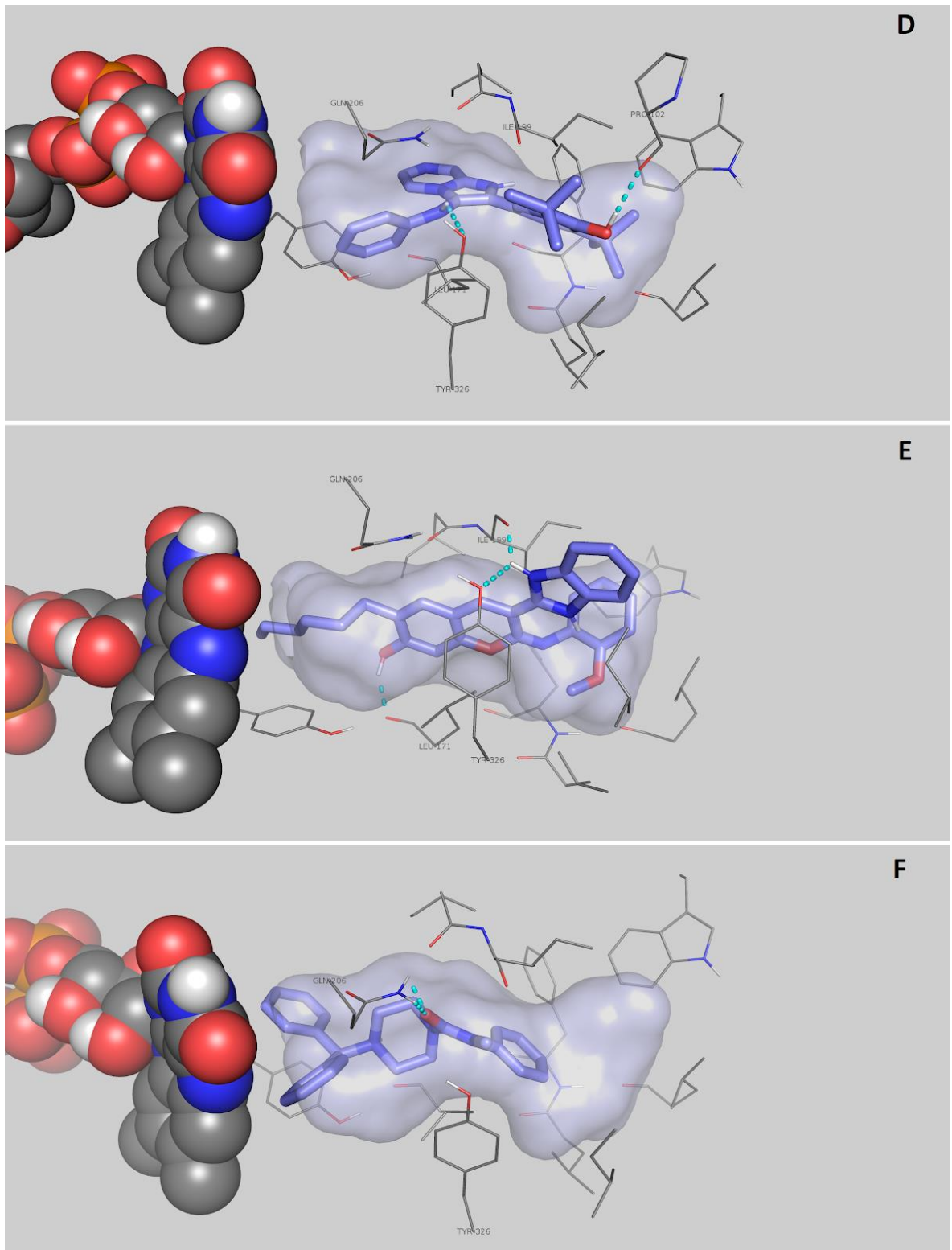
4.1 Telakoinnin tulosten tarkastelu

Molekyylien telakointien tulokset kaikilla telakointiohjelmilla ja -asetuksilla näyttivät selvästi suosivan tiettyjä molekyyliä. Molekyylit 14 ja 17 olivat kaikissa simulaatioissa parhaiden joukossa, ja myös molekyylit 9, 10 ja 20 saivat hyviä telakointituloksia. Huonoiten telakoituvien molekyylien arvioiminen oli haasteellista. PLANTS-ohjelmalla tehdyssä telakoinnissa huonoiten sijoittuivat molekyylit 15, 18 ja 23. Muissa simulaatioissa, jotka suoritettiin Maestrolla, oli 14 molekyyliä, jolle ohjelma ei pystynyt laskemaan ollenkaan tulosta. Tämä johtui siitä, että jos Maestro ei kykene löytämään molekyylielle tarpeeksi hyvää asentoa taskun sisällä, ohjelma ei anna minkäänlaista arvoa telakoinnille. Sen sijaan PLANTS-ohjelma laskee tuloksen molekyylin parhaalle asennolle, vaikka molekyyli ei todellisuudessa mahtuisi sitoutumistaskuun missään asennossa. Telakointitulosten tulkintaa vaikeuttaa myös se, että molekyylielle ei telakoitu vertailun vuoksi yhtään tunnettua MAO-B inhibiittoria. Jos fosfataasiaktiivisuustesteissäkin käytetty pargyliini olisi telakoitu, molekyylien todellisesta sitoutumistehokkuudesta oltaisiin voitu saada tarkempaa tietoa.

Telakoinneissa parhaat tulokset saaneiden molekyylien (9, 14 ja 20) parhaista konformaatioista tehtiin kuvat PyMOL-ohjelmalla (kuva 16). Samoin huonoimmat tulokset saaneiden molekyylien (15, 18 ja 23) parhaista konformaatioista tehtiin kuvat (kuva 17). Kuvista nähdään, että parhaat molekyylit mahtuvat sitoutumistaskuun hyvin, täyttävät sitoutumistaskun tilan kohtalaisen hyvin ja muodostavat 1-2 vetysidosta taskun kanssa. Huonoimmat molekyylit eivät mahdu sitoutumistaskuun kunnolla, mutta kuitenkin muodostavat 2-3 vetysidosta taskun kanssa. Tästä voidaan päätellä, että vetysidokset ja heikot vuorovaikutukset sitoutumistaskun kanssa eivät ole yhtä tärkeitä sitoutumistehokkuuden kannalta kuin molekyylin oikea koko ja muoto suhteessa taskun kokoon ja muotoon.



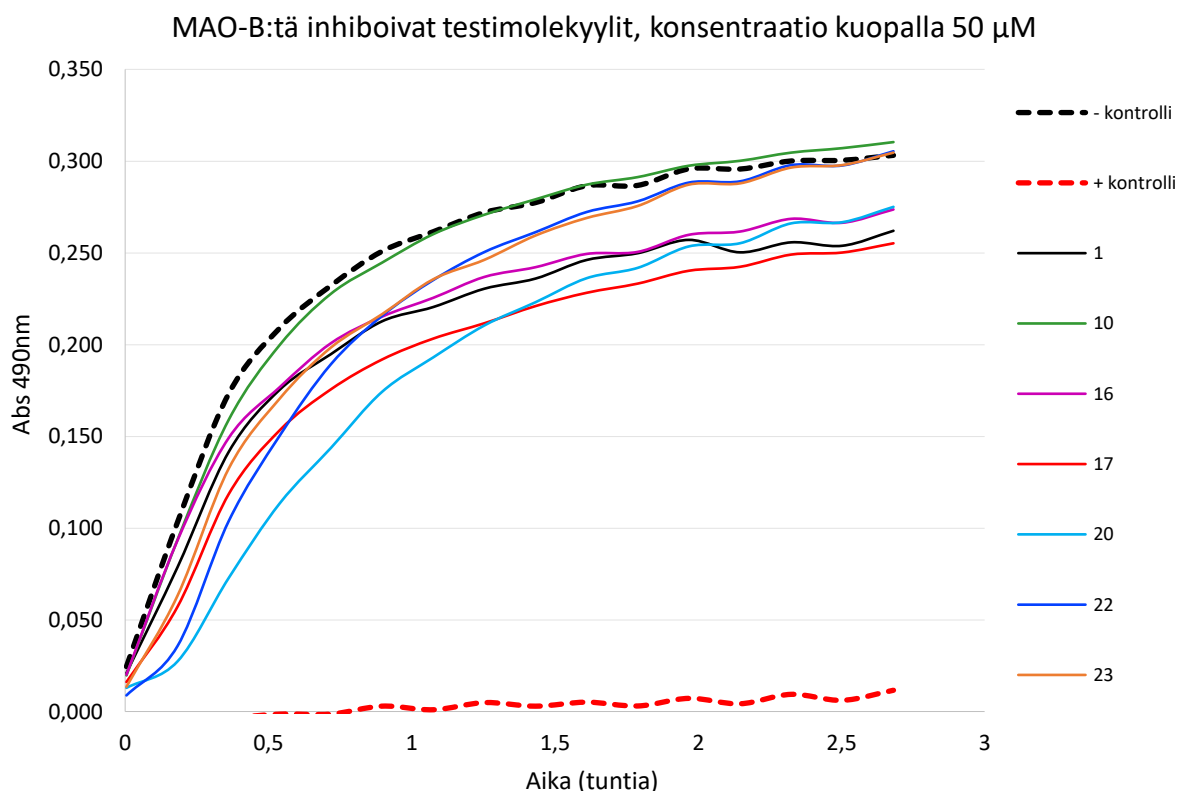
Kuva 16. Telakointisimulaatioiden parhaiden molekyylien parhaat asennot MAO-B:n sitoutumistaskussa. Kuvassa A on esitettyä molekyyli 9, kuvassa B on esitettyä molekyyli 14 ja kuvassa C on esitettyä molekyyli 20 MAO-B:n sitoutumistaskussa. Kuvissa MAO-B:n FAD-kofaktori on kuvattuna palloina, sitoutumistasku harmaalla ja tärkeimmät aminohappotähteet tikkumalleilla. Testimolekyylien hiilirungot ovat kuvassa vihreällä, työt sinisellä ja hapet punaisella. Mahdolliset vetysidokset ovat merkittynä sinisillä katkoviivoilla.



Kuva 17. Telakointisimulaatioiden huonoimpien molekyylien parhaat asennot MAO-B:n sitoutumistaskussa. Kuvassa D on esitettyä molekyyli 23, kuvassa E on esitettyä molekyyli 18 ja kuvassa F on esitettyä molekyyli 15 MAO-B:n sitoutumistaskussa. Kuvissa MAO-B:n FAD-kofaktori on kuvattuna palloina, sitoutumistasku harmaalla ja tärkeimmät aminohappotähteet tikkumalleilla. Testimolekyylien hiilirungot ovat kuvassa vaalean sinisellä, tyypet tumman sinisellä ja hapet punaisella. Mahdolliset vetysidokset ovat merkittyinä sinisillä katkoviivoilla.

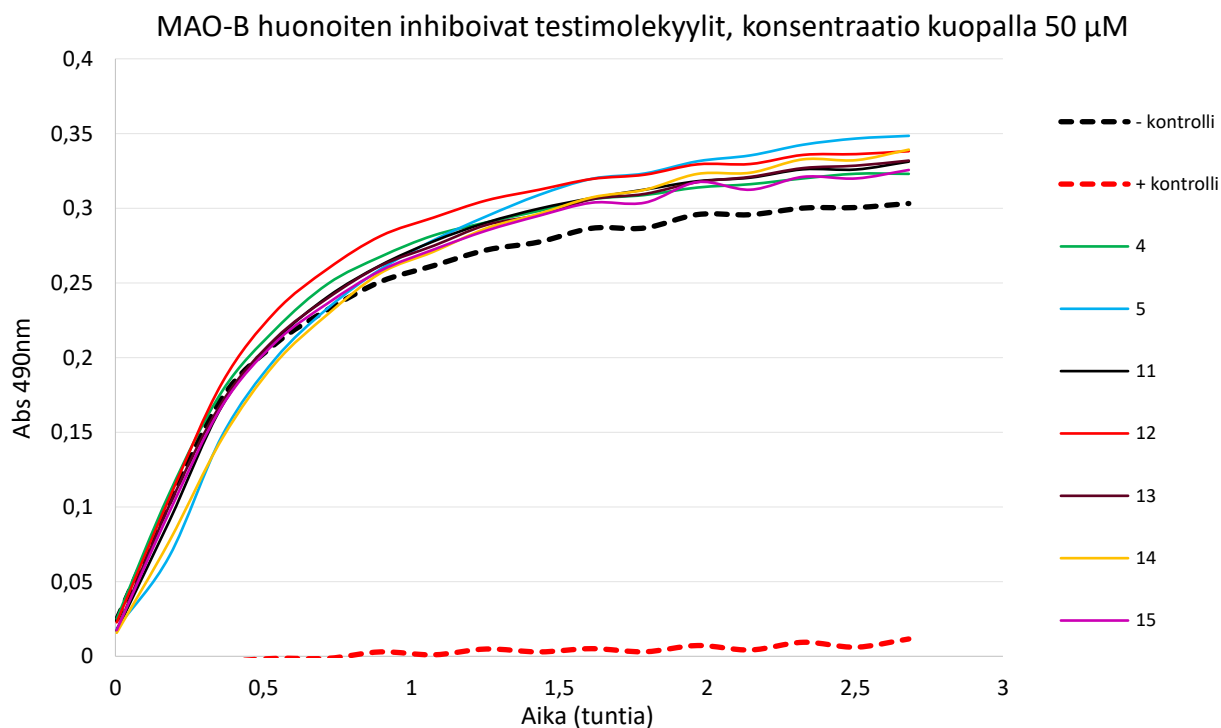
4.2 Fosfataasiaktiivisuustestien tulosten tarkastelu

Fosfataasiaktiivisuustesteissä eri molekyylien välillä ei ollut suuria eroja inhibiitotehokkuudessa. Parhaiten inhibiittoreina toimivat molekyylit olivat 1, 17 ja 20 (kuva 18). Myös molekyylit 10, 16, 22 ja 23 inhiboivat MAO-B:tä jonkin verran. Kuvaajasta kuitenkin nähdään pargyliinin ylivertainen inhibiitotehokkuus uusiin inhibiittoreihin verrattuna. Pargyliini inhiboi MAO-B:n lähes täydellisesti 10 nM konsentraatiolla, kun taas parhaat testimolekyylit saivat reaktiota juuri ja juuri hidastettua 50 μ M konsentraatiolla.



Kuva 18. MAO-B:tä parhaiten inhiboivat testimolekyylit. Kuvassa negatiivinen kontrolli (inhiboimaton reaktio) on esitettyä mustalla katkoviivalla ja positiivinen kontrolli (10 nM pargyliini) punaisella katkoviivalla.

Aktiivisuustesteistä pystyttiin myös erottamaan huonoiten inhiboivat molekyylit (kuva 19). Näitä olivat molekyylit 5 ja 12. Testeissä oli myös monia muita molekyyliä, joiden lisääminen reaktioon kasvatti MAO-B:n aktiivisuutta negatiiviseen kontrolliin verrattuna. Tutkituista molekyyleistä noin puolet olivat inhiboivia ja puolet aktiivisuutta kasvattavia. Testien tuloksiin on voinut myös vaikuttaa DMSO:n käyttö liuottimena ja sen suuri konsentraatio lopullisessa reaktiossa, sillä DMSO voi joko vahvistaa tai heikentää molekyylin sitoutumisen todellista voimakkuutta. Samojen molekyylien eri mittauksista oli huomattavissa molekyylien samanlainen fosfataasiaktiivisuus kontrolleihin ja muihin molekyyliin verrattuna, eli tutkimus on hyvin toistettavissa.



Kuva 19. Fosfataasiaktiivisuustestin huonoimmat molekyylit. Kuvassa negatiivinen kontrolli (inhiboimaton reaktio) on esitettyä mustalla katkoviivalla ja positiivinen kontrolli (10 nM pargyliini) punaisella katkoviivalla.

4.3 Simulaatioiden ja laboratoriokokeiden tulosten vertailu

Verrattaessa tuloksia telakointien ja aktiivisuusmittausten välillä huomattiin sekä eroja että yhtäläisyyksiä tulosten välillä. Molemmista testeistä molekyylit 17 ja 20 menestyivät hyvin. Tämä viittaa siihen, että telakointiohjelmat onnistuivat jollain tasolla määrittämään parhaiten sitoutuvat molekyylit. Lisäksi molemmista testeistä huonoimpana molekyylinä oli molekyyli 15, mutta muuten vertailussa oli kohtuullisen paljon eroavaisuuksia. Jotkut molekyylit olivat saaneet hyvän arvioinnin telakoinnissa mutta huonon tuloksen fosfataasiaktiivisuustesteissä, ja samaa tapahtui päinvastoin. Joissain tapauksissa Maestro-ohjelmalla ei saatu ollenkaan tulosta molekyylin sitoutumisesta, minkä vuoksi huonoja tuloksia oli sen osalta vaikea määrittää.

Tutkimuksessa käytettyjen testimolekyyliden alkuainekoostumuksen tai tiettyjen rakenteellisten muotojen ei huomattu korreloivan inhibitiotehokkuuden kanssa. Molekyylit, jotka sisälsivät halogeeneja tai rikkiä, saivat sekä hyviä että huonoja tuloksia niin telakoinnissa kuin aktiivisuusmittauksissakin. Myöskään hiilihäkkirakenteet, molekyyliden koko ja molekyyliden paino eivät korreloineet inhibitiotehokkuuden kanssa. Tutkimuksessa ei siis löydetty yhtä tiettyä molekyylirunkoa, jota kannattaisi yksinään tutkia jatkossa tarkemmin.

4.4 Jatkotutkimushaasteet

Saimme tutkimuksessamme hyvin tarkkoja ja johdonmukaisia tuloksia fosfataasiaktiivisuustesteissä, joten jatkotutkimuksissa suositellaan käytettävän samaa menetelmää. Jatkotutkimuksissa tulisi kuitenkin testata esimerkiksi koon, alkuainekoostumuksen ja muodon suhteen erilaisia molekyylejä. Tässä voisi auttaa molekyylitietokannoista molekyylejä etsivän screenaus-ohjelman optimointi MAO-B:n taskun koolle ja muodolle. Telakointiohjelmien ja -asetusten optimointi antamaan tarkempaa tietoa molekyyliden inhibitiotehokkuudesta auttaisi valitsemaan oikeita molekyylejä

laboratoriotesteihin. Myös molekyylien liuottimien ja liuottamisen optimointi olisi tärkeää, sillä testeissämme osa molekyyleistä oli hyvin niukkaliukoisia DMSO:hon. Tulevissa jatkotutkimuksissa olisi myös suositeltavaa käyttää tunnettua MAO-B inhibiittoria (esimerkiksi pargyliiniä) telakoinnissa kontrollina, jotta saataisiin vertailukohta molekyylien inhibiitotehokkuudelle tietokonesimulaatioissa.

KIITOKSET

Haluaisimme kiittää Jyväskylän yliopistoa, Ulla Pentikäistä ja Olli Pentikäistä mahdollisuudesta suorittaa laboratoriokokeet ja tietokonesimulaatiot heidän tiloissaan ja heidän materiaaleillaan. Kiitämme myös Tatu Haatajaa mainiosta ohjauksesta laboratoriossa ja Pekka Postilaa ohjauksesta tietokonesimulaatioiden kanssa.

LÄHTEET

- Bach, A.W., N.C. Lan, D.L. Johnson, C.W. Abell, M.E. Bembenek, S.W. Kwan, P.H. Seeburg ja J.C. Shih. 1988. cDNA cloning of human liver monoamine oxidase A and B: molecular basis of differences in enzymatic properties. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 85:4934.
- Behari, M. ja K.K. Singhal. 2011. Cell based therapies in Parkinson's Disease. *Annals of Neurosciences*. 18:76-83.
- Binda, C., A. Mattevi, ja D.E. Edmondson. 2011. Structural properties of human monoamine oxidases A and B. *International Review of Neurobiology*, 100:1-11.
- Binda, C., F. Hubálek, M. Li, D.E. Edmondson ja A. Mattevi. 2004. Crystal structure of human monoamine oxidase B, a drug target enzyme monotonically inserted into the mitochondrial outer membrane. *FEBS Letters*. 564:225-228.
- Binda, C., M. Li, F. Hubálek, N. Restelli, D.E. Edmondson ja A. Mattevi. 2003. Insights into the mode of inhibition of human mitochondrial monoamine oxidase B from high-resolution crystal structures. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 100:9750-9755.
- Binda, C., P. Newton-Vinson, F. Hubálek, D.E. Edmondson ja A. Mattevi. 2001. Structure of human monoamine oxidase B, a drug target for the treatment of neurological disorders. *Nat.Struct.Biol.* 9:22.
- Carradori, S. ja R. Silvestri. 2015. New Frontiers in Selective Human MAO-B Inhibitors. *J.Med.Chem.* 58:6717-6732.
- Cornish-Bowden, A. 2013. *Fundamentals of Enzyme Kinetics* (4).
- Daina, A., M. Blatter, V. Baillie Gerritsen, P.M. Palagi, D. Marek, I. Xenarios, T. Schwede, O. Michielin ja V. Zoete. 2017. Drug Design Workshop: A Web-Based Educational Tool To Introduce Computer-Aided Drug Design to the General Public. *J.Chem.Educ.* 94:335-344.
- Edmondson, D.E., A. Mattevi, C. Binda ja Hubalek, M Li and F. 2004. Structure and Mechanism of Monoamine Oxidase. *Curr.Med.Chem.* 11:1983-1993.
- Faver, J.C., M.N. Ucisik, W. Yang ja K.M. Merz. 2013. Computer-Aided Drug Design: Using Numbers to Your Advantage. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 4:812-814.
- Greenawalt, J.W. ja C. Schnaitman. 1970. An Appraisal of the Use of Monoamine Oxidase as an Enzyme Marker for the Outer Membrane of Rat Liver Mitochondria. *J.Cell Biol.* 46:173-179.
- Hare, M.L.C. 1928. Tyramine oxidase: A new enzyme system in liver. *Biochem.J.* 22:968-979.
- Holt, A., D.F. Sharman, G.B. Baker ja M.M. Palcic. 1997. A Continuous Spectrophotometric Assay for Monoamine Oxidase and Related Enzymes in Tissue Homogenates. *Anal.Biochem.* 244:384-392.
- Hubalek, F., C. Binda, A. Khalil, M. Li, A. Mattevi, N. Castagnoli ja D.E. Edmondson. 2005. Demonstration of isoleucine 199 as a structural determinant for the selective inhibition of human monoamine oxidase B by specific reversible inhibitors. *J.Biol.Chem.* 280:15761-15766.

Johnston, J.P. 1968. Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue. *Biochemical Pharmacology*. 17:1285-1297.

Kearney, E.B., J.I. Salach, W.H. Walker, R.L. Seng, K. William, Z. Eileen ja T.P. Singer. 1971. The Covalently-Bound Flavin of Hepatic Monoamine Oxidase. *European Journal of Biochemistry*.24:321-327.

Knoll, J. ja K. Magyar. 1972. Some puzzling pharmacological effects of monoamine oxidase inhibitors. *Adv.Biochem.Psychopharmacol*. 5:393-408.

Korb, O., T. Stützle ja T.E Exner. 2006. PLANTS: Application of Ant Colony Optimization to Structure-Based Drug Design. *Lecture Notes in Computer Science*. 4150:247-258.

Krishna, R., M. Ali ja A.A. Moustafa. 2014. Effects of combined MAO-B inhibitors and levodopa vs. monotherapy in Parkinson's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 6:180.

Moore, G.E. 1998. Cramming More Components Onto Integrated Circuits. *Proc IEEE*. 86:82-85.

Shih, J.C., K. Chen ja M.J. Ridd. 1999. Monoamine Oxidase: From Genes to Behavior. *Annu.Rev.Neurosci*. 22:197-217.

Tubert-Brohman, I., W. Sherman, M. Repasky ja T. Beuming. 2013. Improved Docking of Polypeptides with Glide. *J.Chem.Inf.Model*. 53:1689-1699.

Vijayakumar, B., S. Parasuraman, R. Raveendran ja D. Velmurugan. 2014. Identification of natural inhibitors against angiotensin I converting enzyme for cardiac safety using induced fit docking and MM-GBSA studies. *Pharmacognosy Magazine*. 10:644.

Youdim, M. B. H., D. Edmondson ja K.F. Tipton. 2006. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nature Reviews Neuroscience*. 7:295.

Youdim, M.B. H., W. Maruyama ja M. Naoi. 2005. Neuropharmacological, neuroprotective and amyloid precursor processing properties of selective MAO-B inhibitor antiparkinsonian drug, rasagiline. *Drugs Today (Barc)*. 41:369-391.