



УДК 577.152.111\*1'134.088.5:681.3

## КАРТИРОВАНИЕ АКТИВНОГО ЦЕНТРА АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫМИ ЛИГАНДАМИ

© 2000 г. А. С. Куценко<sup>#</sup>, Д. А. Кузнецов, В. В. Поройков\*, В. Г. ТуманянИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,  
117984, Москва, В-334, ГСП-1, ул. Вавилова, 32;

\*Институт биомедицинской химии РАН, Москва

Поступила в редакцию 14.04.99 г. Принята к печати 01.09.99 г.

С целью поиска эффективного ингибитора алкогольдегидрогеназы, структура которого может стать базовой для создания потенциального лекарственного средства, проведено картирование активного центра алкогольдегидрогеназы, включающего никотинамидадениндинуклеотид и ионы Zn, с применением метода молекулярной механики. При проведении процедуры молекулярного докинга (встраивания) использован набор лигандов, содержащих характерные функциональные группы: ион формиата, аммиак, ион аммония, метанол и метиламин. Для каждого из лигандов получен ряд преимущественных участков связывания, которые были ранжированы в порядке убывания энергии взаимодействия с ферментом. Сопоставление выявленных в работе мест связывания лигандов с экспериментальными данными о расположении молекул ингибиторов и воды в известных структурах соответствующих комплексов алкогольдегидрогеназ показывает совпадение сайтов комплексообразования, что служит подтверждением адекватности применения метода и дает условия, которым должен удовлетворять высокоэффективный ингибитор (модель фармакофора).

*Ключевые слова:* алкогольдегидрогеназа; белки, структура, лиганды; докинг, молекулярная механика.

Алкогольдегидрогеназа (КФ 1.1.1.1) – один из важнейших ферментов группы никотинамидадениндинуклеотидзависимых дегидрогеназ, принимающий участие в клеточном цикле метаболизма низкомолекулярных спиртов. Она катализирует окисление в присутствии никотинамидадениндинуклеотида (NAD) первичных и вторичных спиртов до альдегидов. В частности, алкогольдегидрогеназа участвует в утилизации метанола, пропанола, бутанола и этиленгликоля *in vivo*.

Проблема острых отравлений метанолом и этиленгликолем весьма актуальна [1–4]. Один из наиболее перспективных путей выведения организма из состояния острой интоксикации этанолом и его аналогами – ингибирование алкогольдегидрогеназы [5]. Ведущий патогенетический механизм отравлений указанными веществами – критическое повышение в крови содержания альдегидов, которое может привести к летальному исходу. Образование критических количеств альдегидов можно избежать путем блокады активности алкогольдегидрогеназ. Таким образом, инги-

биторы алкогольдегидрогеназ могут быть эффективными антидотами.

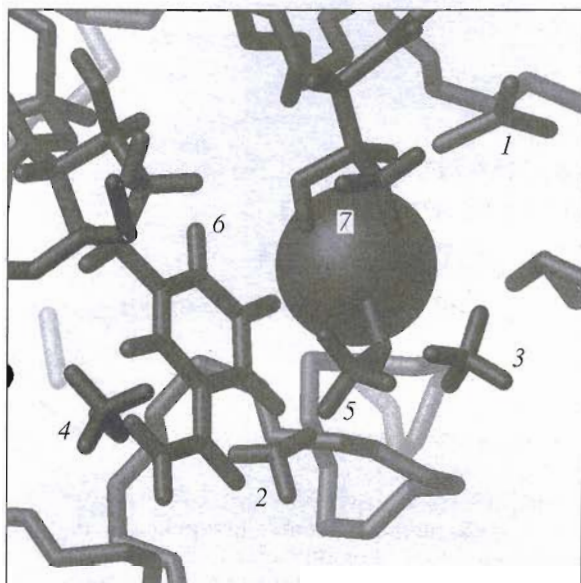
Подобное действие оказывает, например, 4-метилпиразол [6] – субстанция препарата фомепизола, разрешенного к медицинскому применению в США. Он, однако, обладает нежелательным побочным действием – вызывает расстройства экстрапирамидной системы (которая отвечает за произвольную регуляцию сложных двигательных актов). Поскольку известны различные механизмы связывания ингибиторов с алкогольдегидрогеназой [6], можно надеяться найти новые ингибиторы фермента, относящиеся к иным химическим классам и не вызывающие экстрапирамидных расстройств.

На способность подавлять активность алкогольдегидрогеназы тестированы многие химические вещества. К числу известных ингибиторов фермента относятся нирванол, тизерцин, метиаден, аклюрацил, метранидазол, иоталамовая кислота и другие [5]. Таким образом, имеется широкий круг химических соединений разной структуры, в принципе позволяющий отобрать специфические лиганды именно каталитического, а не коферментного центра, и в результате предложить базовую структуру высокоспецифического лекарственного препарата с минимальным побоч-

Сокращения: АЦ – активный центр; NAD – никотинамидадениндинуклеотид.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (095) 135-60-00; e-mail: ku@imb.ac.ru).





**Рис. 1.** Картирование области активного центра алкогольдегидрогеназы. Суперпозиция положений лигандов в комплексах. Цифрами обозначены: 1 – ион формиата  $\text{СНОO}^-$  (комплекс № 1.6. – см. таблицу); 2 – аммиак  $\text{NH}_3$  (№ 2.4.); 3 – ион аммония  $\text{NH}_4^+$  (№ 3.3.); 4 – метанол  $\text{CH}_3\text{-OH}$  (№ 4.2.); 5 – метиламин  $\text{CH}_3\text{-NH}_2$  (№ 5.1.); 6 – кофактор NAD; 7 – атом цинка.

ным действием. Известные ингибиторы алкогольдегидрогеназ вследствие высокой токсичности и ограниченной доступности не могут быть использованы на практике в качестве антидотов [5].

Алкогольдегидрогеназы – объект достаточно хорошо изученный во многих отношениях. В частности, секвенировано свыше 200 первичных структур алкогольдегидрогеназ из различных организмов; для 32 из них расшифрованы и опубликованы пространственные структуры (с разрешением до 1.66 Å) (см. базу данных Брукхэвского банка белковых структур (PDB): <http://www.rcsb.org/pdb/>). Особенно полно исследованы алкогольдегидрогеназы человека и лошади. Определено также множество структур ряда аналогичных ферментов (лактат-, малат- и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы). Все это дает богатый материал для анализа структуры активного центра фермента-мишени с целью конструирования высокоспецифичных ингибиторов алкогольдегидрогеназы человека.

Для решения этой задачи нами применен хорошо зарекомендовавший себя в последнее время метод картирования активных центров ферментов с помощью набора функциональных групп – лигандов [7–9] (см. “Эксперимент. часть”). Термин лиганды употребляется здесь в широком смысле, включая также функциональные группы, которые могут представлять интерес для по-

следующего конструирования более сложных молекул – ингибиторов.

*Докинг лигандов в активном центре алкогольдегидрогеназы.* Исследование активного центра (АЦ) алкогольдегидрогеназы проводилось методом симуляции броуновского движения малых молекул (лигандов) в полости АЦ. В результате для каждого из лигандов было выявлено несколько участков преимущественного связывания, соответствующих минимумам энергии взаимодействия с макромолекулой алкогольдегидрогеназы. В последующем осуществлялась сортировка и отбор участков связывания на основе как геометрических, так и энергетических критериев с целью использования в дальнейшем координат найденных минимумов в качестве основы для построения высокоспецифического ингибитора. Численные характеристики участков связывания для каждого из лигандов приведены в таблице, пространственное положение лигандов в наиболее интересных участках связывания показано на рис. 1. Для картирования АЦ использовали пять лигандов различной природы, отражающих многообразие функциональных групп, потенциально способных специфически взаимодействовать с ферментом.

Два положения каждого из лигандов считали различающимися, если среднее расстояние между ними составляло более чем 2.5 Å, то есть несколько меньшую, чем средний размер самих лигандов. Первоначально предполагалось, что максимальное число отобранных комплексов, наилучших по энергии взаимодействия лиганда с ферментом, будет не более десяти. И действительно, в результате поиска энергетически наиболее предпочтительных конформаций и их анализа оказалось, что число участков связывания меньше этого порога для каждого из лигандов (см. таблицу). Данное обстоятельство позволяет считать проведенную процедуру исчерпывающей. Наибольшее число комплексов (семь) у иона формиата, у остальных лигандов – три-четыре. В большинстве случаев обнаруженные участки связывания каждого из анализируемых соединений не совпадают с участками связывания других лигандов (расположены на расстояниях  $\geq 3$  Å друг от друга). Единственным исключением являются аммиак в конформации 2 (комплекс 2.1.) и метиламин в конформации 1 (комплекс 5.1.), расстояние между участками связывания которых менее 2 Å.

Наибольший интерес с точки зрения реализации высокоспецифического взаимодействия потенциальных ингибиторов с алкогольдегидрогеназой представляли участки связывания, характеризующиеся возможностью образования одной или более специфических водородных связей вблизи каталитического центра фермента. В таблице приведены характеристики наиболее сильных водородных связей для лигандов в данном положении.



## Комплексы лиганд-белок в области активного центра алкогольдегидрогеназы

Номер	Лиганд	Номер комплекса	Энергия взаимодействия*, ккал/моль				Водородные связи**				Окружение лиганда***		
			$E_{total}$	$E_{vw}$	$E_{cl}$	$E_{hb\Sigma}$	Лиганд донор/ак-центрог	Остаток	Длина связи, Å	$E_{hb}$ , ккал/моль	Остатки АЦ	Расстояние (Å) до	
												NAD	Zn
1	Ион формиата	1.1.	-32.34	-4.91	-26.89	-0.54	-	-	-	-	Val318	4.9	3.7
		1.2.	-30.92	-5.48	-24.92	-0.52	-	-	-	-	Val294	3.3	3.3
		1.3.	-30.70	-6.90	-23.25	-0.55	-	-	-	-	Phe93	3.4	3.4
											Cys174		
		1.4.	-30.59	-4.76	-24.20	-1.63	а	Thr48	1.9	-1.36	Thr48	3.5	3.4
		1.5.	-26.94	-2.87	-22.82	-1.24	а	NAD	2.3	-0.70		7.4	6.6
		1.6.	-7.57	-2.19	0.21	-5.59	д	Asp49	1.8	-2.63	Asp49	9.5	6.8
							а	Cys46	2.1	-0.99	Cys46		
							а	His67	1.8	-1.20	His67		
											Gly44		
											Glu68		
		1.7.	-6.24	-2.83	0.43	-3.84	д	His67	2.1	-1.17	His67	8.7	8.7
							а	Tyr319	2.0	-1.31	Tyr319		
							а	Phe93	2.1	-0.93	Phe93		
											Pro91		
											Gly173		
		2	Аммиак	2.1.	-4.50	-3.57	-0.08	-0.86	д	NAD	2.3	-0.86	
2.2.	-4.43			-3.67	-0.06	-0.11	-	-	-	-	Phe93	4.0	3.4
2.3.	-4.27			-2.64	-0.12	-1.51	д	Ala317	2.0	-1.46	Ala317	5.7	10.0
											Thr178		
											Ser182		
											Gly320		
2.4.	2.34			5.49	-0.33	-2.82	д	Thr178	1.8	-2.73	Thr178	3.0	5.2
									Phe93				
									Cys174				
									Tyr319				
3	Ион азобония	3.1.	-7.43	-2.16	-0.94	-4.34	д	Phe93	2.0	-1.52	Phe93	8.1	9.7
							д	Thr94	1.8	-2.63	Thr94		
											Asn114		
		3.2.	-5.15	5.31	-3.50	-6.96	д	Val151	1.8	-1.54	Val151	17.6	9.5
							д	Thr143	2.0	-1.34	Thr143		
							д	Thr150	1.8	-2.69	Thr150		
							д	His139	2.4	-0.58	His139		
											Gly142		
		3.3.	0.12	-2.84	2.96	0	-	-	-	-	Leu57	5.8	8.0
											Leu116		
3.4.	0.13	-2.88	3.01	0	-	-	-	-	Phe93	5.6	7.2		
									Leu141				

Таблица. (Окончание)

Номер	Лиганд	Номер комплекса	Энергия взаимодействия*, ккал/моль				Водородные связи**				Окружение лиганда***		
			$E_{total}$	$E_{vw}$	$E_{el}$	$E_{hb\Sigma}$	Лиганд донор/акцептор	Остаток	Длина связи, Å	$E_{hb}$ , ккал/моль	Остатки АЦ	Расстояние (Å) до	
												NAD	Zn
4	Метанол	4.1.	-12.10	-3.30	-3.97	-4.84	д	Pro296	2.1	-1.29	Pro296	15.7	2.2
							д	Gln299	2.0	-1.54	Gln299		
											Pro295		
											Ser298		
		4.2.	-8.40	-4.89	-0.32	-3.18	д	Val292	1.9	-1.64	Val292	6.5	11.4
							д	Gly293	2.0	-1.44	Gly293		
		4.3.	-7.21	-3.58	-1.36	-2.27	д	Pro296	2.1	-1.30	Pro296	14.6	3.6
							а	Ser298	2.1	-0.98	Ser298		
4.4.	-6.55	-3.56	-0.41	-2.59	д	Ile291	1.9	-1.62	Ile291	8.1	11.4		
					а	Ala317	2.1	-0.97	Ala317				
5	Метиламин	5.1.	-6.58	-5.64	0	-0.95	д	NAD	2.2	-0.97	Phe93	3.5	3.6
		5.2.	-6.03	-4.66	0	-1.38	д	NAD	2.1	-1.38	Phe93	3.8	5.7
		5.3.	-5.89	-4.68	0	-1.21	д	NAD	2.2	-1.21	Phe93	4.6	6.6

\* Энергия взаимодействия лиганда в комплексе с ферментом, кофактором и атомами цинка –  $E_{total}$  и ее составляющие: энергия ван-дер-ваальсовых взаимодействий –  $E_{vw}$ , электростатических взаимодействий –  $E_{el}$  и водородных связей –  $E_{hb\Sigma}$ .

\*\* Для водородных связей указаны остатки, с которыми взаимодействует лиганд, донором (д) или акцептором (а) является лиганд, длины и энергии связей –  $E_{hb}$ . Водородные связи, энергии которых не превышают по абсолютной величине 0.5 ккал/моль, не приведены. Прочерк означает отсутствие вышеуказанных водородных связей.

\*\*\* В окружении лиганда указывались аминокислотные остатки, атомы которых находились на расстоянии не более 3 Å от лиганда. Для каждого из лигандов также приведены расстояния от наиболее электроотрицательных атомов лиганда до реакционного атома углерода C4N NAD и атома Zn.

Их соответствующие параметры должны быть использованы на последующей стадии при построении моделей перспективных химических соединений.

По существу, исчерпывающий перебор возможных конформационных состояний лигандов при проведении процедуры поиска методом Монте-Карло, разнообразие соединений или их фрагментов, использованных в качестве тестовых лигандов, и широкий спектр участков связывания (как с точки зрения соответствующих величин энергии связывания, так и с точки зрения положения в АЦ фермента) позволяют утверждать, что в рамках использованной модели выявлены все возможные места связывания лигандов в поле активного центра.

Сопоставление полученных в работе мест связывания с экспериментальными данными о связывании ингибиторов и воды. Комбинация наиболее выгодных сайтов комплексообразования позволяет построить модели фармакофоров, дающие представление о требованиях, которым дол-

жен удовлетворять эффективный ингибитор фермента. Для того, чтобы дать независимую оценку смоделированных мест связывания для лигандов, мы провели сравнение этих сайтов с сайтами связывания ингибиторов, а также молекул воды в экспериментально определенных структурах. Сопоставление с водой представляется необходимым, поскольку естественно предположить, что молекулы воды способны занимать большинство потенциальных мест связывания в структуре фермента в кристалле. Следует заметить, что изначально вода не включалась в моделируемую систему (в список лигандов) из тех соображений, что, во-первых, молекула воды не является адекватным фрагментом фармакофора, и, во-вторых, для строгого моделирования сайтов связывания воды было бы необходимо рассчитывать ансамбль кластеров (сетку) молекул воды, что не дает возможности прямого сравнения с сайтами связывания лигандов. Поэтому акцент делался на экспериментальные данные, тем более что в этом случае статистика достаточно велика.



При анализе всех мест связывания молекул воды в области АЦ алкогольдегидрогеназы были выявлены 22 участка их предпочтительного связывания. Затем выявленные участки связывания молекул воды сопоставлялись с расчетными участками связывания лигандов в моделируемой структуре и с экспериментально установленными сайтами связывания молекул ингибиторов в различных алкогольдегидрогеназах. Оказалось, что участки связывания большинства лигандов совпадают с областями преимущественного связывания молекул воды. Это обстоятельство свидетельствует о том, что области связывания воды, взятые за основу для сравнения данных о связывании ингибиторов и лигандов, действительно адекватно отражают энергетические требования к участкам связывания.

Сопоставление с лигандами позволяет выявить шесть соответствующих им областей преимущественного связывания воды, сопоставление с ингибиторами – четыре. Из шести участков связывания молекул воды, соответствующих связыванию лигандов, и четырех участков, соответствующих связыванию ингибиторов, три участка совпадают. Таким образом, в области АЦ алкогольдегидрогеназы выявлены наиболее предпочтительные места связывания, охватывающие лиганды, ингибиторы и воду. Хотя может показаться, что совпало незначительное количество мест связывания, следует отметить, что среди 22 участков связывания для воды большинство из них отвечают, по-видимому, слабому взаимодействию с белком, в то время как участки связывания лигандов являются наиболее энергетически выгодными.

В качестве дополнительного теста проведено также сопоставление сайтов связывания ингибиторов в экспериментально установленных структурах и лигандов в моделируемой системе. Совпадение сайтов связывания проиллюстрировано на рис. 2 на примере иона ацетата – ингибитора сигма-алкогольдегидрогеназы человека [10] – и одного из лигандов – иона формиата. Очевидно соответствие найденных используемым методом сайтов связывания лигандов с экспериментально определенными сайтами связывания некоторых известных ингибиторов алкогольдегидрогеназы.

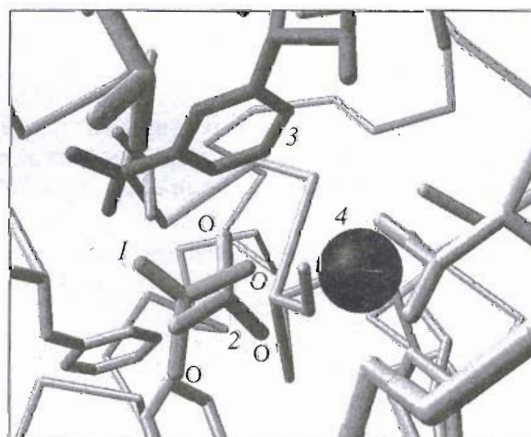
Таким образом, при сопоставлении полученных в данной работе участков связывания лигандов с экспериментальными данными о структурных деталях связывания молекул ингибиторов и воды выявлены совпадающие сайты комплексообразования, что служит подтверждением подхода и позволяет получить ограниченный набор условий, которым должен удовлетворять высокоэффективный ингибитор (модель фармакофора). Тем самым становится реальным целенаправленное конструирование некоторых химических соединений – потенциальных лекарственных средств.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Моделирование структур.** Для моделирования структур белка, лигандов и их комплексов, а также расчета внутри- и межмолекулярных взаимодействий была использована хорошо зарекомендовавшая себя программа молекулярной механики ICM [11], применимая для расчета сложных белковых систем [12, 13].

В программе ICM структура биологических макромолекул моделируется исходя из набора внутренних координат, в которые входят: длины ковалентных связей, валентные и торсионные углы. Трехмерная структура биополимера представляется в виде направленного графа (дерева) без замыканий, в узловых точках которого находятся пронумерованные атомы. Алгоритм позволяет считать произвольный набор переменных фиксированным. В сочетании с представлением молекулы во внутренних координатах такой подход допускает моделирование конформационных перестроек в биополимерах в приближении жесткой геометрии, то есть при фиксированных значениях всех длин связей, всех валентных и некоторых торсионных углов, например, торсионных углов, отвечающих за плоскостность пептидной связи или ароматических колец. Использование данного подхода значительно понижает размерность пространства переменных, обеспечивая эффективность минимизации функции энергии системы.

Расчеты и визуализация результатов были выполнены на графической станции SGI 4D70GT и на PC Pentium II.



**Рис. 2.** Сопоставление сайтов связывания лигандов с сайтами связывания ингибиторов. Суперпозиция положений лиганда в комплексе и ингибитора в сигма-алкогольдегидрогеназе человека. Цифрами обозначены: 1 – ион формиата  $\text{HCOO}^-$  (комплекс № 1.2. – см. таблицу); 2 – ион ацетата  $\text{CH}_3\text{-COO}^-$ ; 3 – кофактор NAD; 4 – атом цинка. Для ионов ацетата и формиата указаны атомы кислорода их карбоксильных групп; показан атом водорода иона формиата.



**Оптимизация определенной экспериментальной структуры алкогольдегидрогеназы.** Модель алкогольдегидрогеназы человека была построена на основе структуры 1HDY PDG (комплекс алкогольдегидрогеназы с  $\text{NAD}^+$  и с 4-йодпиразолом (iodopyrazole), разрешение 2.5 Å, наилучшее для алкогольдегидрогеназы человека). На первом этапе выполнена подготовительная процедура, которая состояла в приведении длин связей и валентных углов в соответствии с моделью фиксированных состояний к стандартным (идеальным) значениям с последующей минимизацией расстояний между атомами модели и атомами экспериментальной структуры. Указанная процедура обеспечивает уточнение используемой для модельных экспериментов структуры, в частности идентификацию положения водородных атомов, не определяемых рентгенографически. Среднеквадратичное отклонение координат атомов между экспериментальной структурой и структурой, полученной в результате оптимизации, незначительно и составляет 0.4 Å. Более подробно данная процедура описана в [11].

**Метод картирования активного центра фермента.** Для конструирования оптимальных соединений, потенциально способных взаимодействовать с ферментом-мишенью и служить высокоспецифичными ингибиторами, в последние годы нашел применение метод картирования активного центра фермента, аналогичный описанному в работах [7–9]. Авторы исходят из предположения, что “якорные” места связывания малой молекулы лиганда с белком соответствуют локальным минимумам энергии взаимодействия фармакофора с белком. Поиск таких мест в рамках данного метода проводится с использованием типичных для низкомолекулярных органических соединений функциональных групп – лигандов, которые могут входить в состав гипотетического фармакофора в качестве фрагментов целой молекулы и обеспечивать заданные свойства моделируемой структуры – связывание ингибитора ферментом.

**Выбор лигандов.** В качестве лигандов для картирования активного центра алкогольдегидрогеназы нами использован набор различных фрагментов органических соединений, представляющих собой важнейшие функциональные группы возможного ингибитора. Были выбраны достаточно простые молекулы, имеющие молекулярные веса в пределах 17–32 а.е. Небольшой размер тестовых молекул важен для эффективного поиска мест связывания лигандов, поскольку обеспечивает преодоление локальных минимумов конформационного пространства, доступного для данного лиганда. При выборе лигандов принимались во внимание как разнообразие физико-химических свойств лигандов, так и возможность размещения лиганда в области активного центра

белка. Лиганды должны обеспечивать формирование сеток водородных связей, образуемых, как правило, с вовлечением атомов азота и кислорода и вносящих основной вклад в специфическое узнавание фармакофора белком. Важно принять во внимание и возможность использования лигандов для последующего построения более крупной молекулы-ингибитора, имея в виду помимо особенностей конструирования фармакофора также и доступность при химическом синтезе.

На основе этих критериев были отобраны в качестве лигандов: 1) ион формиата  $\text{HCOO}^-$ ; 2) аммиак  $\text{NH}_3$ ; 3) ион аммония  $\text{NH}_4^+$ ; 4) метанол  $\text{CH}_3\text{-OH}$  и 5) метиламин  $\text{CH}_3\text{-NH}_2$ . Два лиганда (ион формиата и ион аммония) несут заряды, противоположные по знаку; метанол, метиламин и аммиак являются полярными молекулами, не несущими заряда. Все это дает возможность искать различные по типу “якорные” места связывания лиганда с белком.

**Докинг лигандов в активном центре алкогольдегидрогеназы.** Поиск “якорных” мест связывания был проведен с помощью итеративной процедуры докинга (встраивания) выбранных фрагментов (лигандов) в силовом потенциальном поле активного центра алкогольдегидрогеназы. Докинг (встраивание) каждого из фрагментов осуществляли путем симуляции хаотического движения. Процедура включала циклическое повторение следующих этапов:

перенос молекулы лиганда в случайном направлении в пространстве на случайное расстояние в пределах задаваемого наибольшего расстояния;

поворот молекулы лиганда вокруг оси, имеющей случайную ориентацию, на случайный угол в пределах  $[-180^\circ, 180^\circ]$ ;

вариации двугранных углов, соответствующих атомам белка, расположенным вблизи области контакта молекулы лиганда с белковой глобулой. Этот набор атомов включал в себя атомы белка, лежащие внутри объединения объемов, образованных сферами заданного радиуса (обычно радиус сферы выбирается в пределах 5–9 Å) вокруг каждого из атомов лиганда, в то время как все торсионные углы лиганда всегда оставались незафиксированными; таким образом, подвижными считались часть белка вблизи лиганда и сам лиганд, в то время как остальная часть белка считалась жесткой и не участвовала в конформационных перестройках;

поиск оптимальной конформации боковых цепей аминокислот, расположенных вблизи точки контакта лиганд-белок, методом Монте-Карло;

поиск оптимальной конформации полипептидного остова (с применением метода локальной деформации) и боковых цепей аминокислот, расположенных вблизи точки контакта методом



Монте-Карло. Подробное описание использованной процедуры оптимизации, реализованной в программе молекулярной механики ICM, приведено в [11].

В качестве стартовой конформации принимали расположение лиганда в поле активного центра алкогольдегидрогеназы (свободная область, находящаяся между атомом Zn активного центра, никотиновым кольцом кофактора NAD и остатком Thr48). Эта область стерически доступна для лигандов, близких по размеру к этанолу. Вычислительная процедура позволяет путем наложения "штрафных" потенциалов ограничивать перемещения тестируемого лиганда ("блуждание") областью АЦ фермента.

Энергия взаимодействия тестируемого лиганда и алкогольдегидрогеназы в каждой точке конформационного пространства рассчитывалась как сумма сил Ван-дер-Ваальса, водородных связей и электростатического взаимодействия между атомами лиганда, молекулы алкогольдегидрогеназы, кофактора NAD и атомом цинка с использованием параметров ECEPP/3 [14–17]. Парциальные заряды на атомах лигандов, кофактора и атоме цинка были рассчитаны с помощью метода полуэмпирического анализа CNDO [18] с использованием программы HyperChem 3.0 [19]. После расчета энергии системы найденная точка либо принимается, либо отвергается на основании критерия Метрополиса [20] в соответствии с "температурой" системы, и процедура докинга переходит к новой итерации.

Найденные в результате расчетов положения лиганда и соответствующие им комплексы алкогольдегидрогеназ сортировали по энергии и степени близости к активному центру и друг к другу; преимущество отдавали положению с меньшей энергией и наиболее близкому к АЦ, параметры которого сохраняли для последующей оценки.

**Сравнение смоделированных мест связывания лигандов с местами связывания ингибиторов и воды в экспериментально определенных структурах.** Для анализа мест связывания воды из PDB-банка взяты структуры алкогольдегидрогеназ, рентгенографические данные которых содержат координаты молекул воды. Было отобрано 22 таких белка. Все белки ориентировались одинаковым образом по данным их попарного пространственного наложения согласно банку структурных выравниваний FSSP [21]. Рассмотрение ограничивалось сферой радиусом 10 Å с центром на атоме каталитического Zn, включающей область моделирования сайтов комплексообразования. Затем все места связывания молекул воды, попавшие в эту область, объединялись в группы. Группой считали набор из тех молекул воды, чьи центры тяжести попадают в сферу радиусом 1.4 Å, которой принято аппроксимировать молекулу

воды. Распределив все места связывания воды по таким сферам, получили 54 области преимущественного связывания в районе АЦ фермента, из которых основной интерес представляют 22 области, включающие две и более молекулы воды из экспериментальных структур.

Затем проведено сопоставление выявленных участков связывания молекул воды с экспериментально установленными участками связывания ингибиторов в различных алкогольдегидрогеназах и с расчетными участками связывания лигандов в моделируемой структуре. Сравнение проводили по положению атомов кислорода. Исходно отобрано 13 структур белков, содержащих ингибиторы, причем 10 ингибиторов имеют различную химическую природу. Оказалось, что в 12 случаях молекулы ингибиторов занимают области преимущественного связывания воды. Всего таких областей выделено четыре. Это свидетельствует о том, что области связывания воды, взятые за основу для сравнения данных о связывании ингибиторов и лигандов, адекватно отражают энергетические требования к участкам связывания.

Сходная процедура сравнения выполнена для всех 11 комплексов двух лигандов моделируемой структуры, содержащих кислород (лиганды № 1 и № 4). Семь из них совпали с участками преимущественного связывания молекул воды. Всего было выявлено шесть областей преимущественного связывания воды. Для четырех из них, соответствующих связыванию ингибиторов, и шести, соответствующих связыванию лигандов, три совпадают.

В то же время с целью дополнительной проверки, также проведено сравнение сайтов связывания ингибиторов в экспериментально установленных структурах и лигандов в моделируемой системе. Сравнение велось по положениям атомов азота и кислорода. Исходно были взяты все пять лигандов во всех 22 промоделированных комплексах и 11 молекул ингибиторов различной химической природы в 16 белковых структурах из банка PDB. Совпадающими оказались четыре модельных комплекса и семь ингибиторов: ион ацетата, йодпиразол, циклогексанол, *N*-циклогексилформамид, *N*-формилпиперидин, диметилсульфоксид и истинный субстрат – этанол.

Работа выполнена при финансовой поддержке секции 04 "Компьютерное конструирование новых лекарственных средств" подпрограммы "Создание лекарственных средств методами химического и биологического синтеза" ФЦНТП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники гражданского назначения" (проект 04.01.01).



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Породенко В.А., Варшавец Н.П., Перова Т.П. // Суд.-мед. экспертиза. 1989. Т. 32. С. 61–62.
2. Anderson T.J., Shuaib A., Becker W.J. // Can. J. Neurol. Sci. 1989. V. 16. P. 432–435.
3. Puka J., Szajewski J. // Pol. Arch. Med. Wewn. 1988. V. 80. P. 88–98.
4. Momont S.L., Dahlberg P.J. // Wis. Med. J. 1989. V. 88. P. 16–20.
5. Кожемякин Л.А., Зеленин К.Н., Бонитенко Ю.Ю., Иванова Л.И., Ершов А.Ю., Земляной А.В., Королюк М.А. // Вопросы мед. химии. 1990. Т. 36. С. 67–69.
6. Li T.K., Bosron W.F., Dafeldecker W.P., Lange L.G., Vallee B.L. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 4378–4381.
7. Bohm H.-J. // J. Comp. Aided Mol. Des. 1992. V. 6. P. 593–606.
8. Cafilisch A., Miranker A., Karplus M. // J. Med. Chem. 1993. V. 36. P. 2142–2167.
9. Eisen M.B., Wiley D.C., Karplus M., Hubbard R.E. // Proteins. 1994. V. 19. P. 199–221.
10. Xie P., Parsons S.H., Speckhard D.C., Bosron W.F., Hurley T.D. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 18558–18563.
11. Abagyan R., Totrov M., Kuznetsov D. // J. Comp. Chem. 1994. V. 15. P. 488–506.
12. Luescher I., Romero P., Kuznetsov D., Rimoldi D., Coulie P., Cerrotini J.-C., Jongeneel V. // JBC. 1996. V. 271. P. 12463–12471.
13. Anjuere F., Kuznetsov D., Romero P., Cerrotini J.-C., Jongeneel V., Luescher I. // JBC. 1997. V. 272. P. 8505–8514.
14. Momany F.A., McGuire R.F., Burgess A.W., Scheraga H.A. // J. Phys. Chem. 1975. V. 7. P. 2361–2380.
15. Nemethy M.S., Pottle M.S., Scheraga H.A. // J. Phys. Chem. 1983. V. 87. P. 1833–1851.
16. Sippl M.J., Nemethy G., Scheraga H.A. // J. Phys. Chem. 1984. V. 88. P. 6231–6233.
17. Nemethy G., Gibson K.D., Palmer K.A., Yoon C.N., Paterlini G., Zagari A., Rumsey S., Scheraga H.A. // J. Phys. Chem. 1992. V. 96. P. 6472–6484.
18. Chau P.L., Dean P.M. // J. Comp. Aided Mol. Des. 1992. V. 6. P. 407–426.
19. Froimowitz M. // Biotechniques. 1993. V. 14. P. 1010–1013.
20. Metropolis N.A., Rosenbluth A.W., Rosenbluth N.M., Teller A.H., Teller E. // J. Chem. Phys. 1953. V. 21. P. 1085–1090.
21. Holm L., Sander Ch. // J. Mol. Biol. 1993. V. 233. P. 123–138.

## Mapping of the Active Site of Alcohol Dehydrogenase with Low-molecular Ligands

A. S. Kutsenko\*<sup>#</sup>, D. A. Kuznetsov\*, V. V. Poroikov\*\*, and V. G. Tumanyan\*

\* Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, GSP-1 Moscow, 117984 Russia

\*\* Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Pogodinskaya 10, Moscow, 119832 Russia

In search of an active alcohol dehydrogenase inhibitor, the structure of which may serve as the basis for a potential drug design, the active site of alcohol dehydrogenase containing NAD and Zn<sup>2+</sup> ions was mapped using the method of molecular mechanics. Molecular docking was performed using a number of ligands containing characteristic functional groups: formate ion, ammonia, ammonium ion, methanol, and methylamine. Sites of preferable binding were revealed for each ligand and arranged in order of decreasing energy of binding to the enzyme. A comparison of the predicted ligand-binding sites and the experimental data on the location of water and inhibitor binding sites in the known structures of corresponding alcohol dehydrogenase complexes indicated a coincidence of the complex formation sites, which confirms the validity of the method and provides the requirements for a highly effective inhibitor (the pharmacophore model).

*Key words:* alcohol dehydrogenase; proteins, structure, ligands; docking; molecular mechanics

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; phone +7 (095) 135-6000; e-mail: ku@imb.imb.ac.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 3. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.