

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG GẮN KẾT CỦA MỘT SỐ FLAVONOID TRÊN ENZYM ACETYLCHOLINESTERASE BẰNG MÔ HÌNH MÔ TẢ PHÂN TỬ DOCKING

Thái Khắc Minh*, Huỳnh Thị Ngọc Phương*, Đào Thị Thanh Hà*, Trần Thái Sơn**

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Chất ức chế acetylcholinesterase (AChEI) là nhóm thuốc đầu tiên và phát triển nhất được chấp thuận để điều trị triệu chứng bệnh Alzheimer (AD). Gần đây một số báo cáo đã chứng minh khả năng ức chế acetylcholinesterase (AChE) của các flavonoid.

Mục tiêu: Nghiên cứu khả năng gắn kết ở mức độ phân tử của một số dẫn chất flavonoid trên enzym AChE bằng mô hình mô tả phân tử docking. Từ đó định hướng tổng hợp một số dẫn chất có hoạt tính ức chế AChE mạnh.

Phương pháp: Trong nghiên cứu này sự gắn kết với cấu trúc không gian mục tiêu tác động của các phân tử mới thuộc nhóm flavonoid (dẫn chất isoflavon H-8, H-14 và dẫn chất auron TH-27, TH-29, TH-33, TH-35) có tiềm năng ức chế AChE được thực hiện bằng phần mềm FlexX, trên cơ sở cấu trúc tinh thể của phức TcAChE(-)-Galanthamin.

Kết quả: Kết quả docking cho thấy ngoài các tương tác với các acid amin vùng xúc tác AChE, các dẫn chất isoflavon và auron nói trên, đặc biệt là các auron, đều thể hiện tương tác với Trp279, acid amin quan trọng nhất của vùng ngoại biên AChE. Ngoài ra, sự tương tác của nhân phenyl trong các cấu trúc nói trên với các acid amin như Phe290, Phe288, Phe331, Tyr334 có thể là một ưu điểm cho hoạt tính ức chế enzym, vì các acid amin này là phân khác biệt giữa AChE và butyrylcholinesterase. Vì vậy các dẫn chất mới này được hi vọng sẽ là những chất ức chế hiệu quả và chọn lọc hơn trên AChE.

Kết luận: Mô hình mô tả phân tử docking cho thấy khả năng gắn kết mạnh giữa các dẫn chất isoflavon, auron và AChE. Kết quả này có thể ứng dụng thiết kế ra những phân tử có tác dụng sinh học tốt hơn.

Từ khóa: docking, acetylcholinesterase, AChE, Alzheimer, flavonoid, auron.

ABSTRACT

MOLECULAR MODELING STUDY ON ACETYLCHOLINESTERASE AND NEW FLAVONOID DERIVATIVES

Thai Khắc-Minh, Huynh Thi Ngọc Phương, Dao Thi Thanh Ha, Tran Thai Son

* Y Hoc TP. Ho Chi Minh * Vol. 15 - Supplement of No 1 - 2011: 406 - 412

Background: Acetyl cholinesterase inhibitors (AChEI) have been approved for treatment of symptoms of Alzheimer's disease (AD). Recently, the activity of acetyl cholinesterase inhibition of flavonoid compounds was also proved.

Objectives: Molecular modeling study between acetylcholinesterase and new flavonoid derivatives is performed by docking.

Methods: In the study, molecular docking simulation for new flavonoid structures, which are potential AChE inhibitors, (isoflavon derivatives H-8, H-14 and aurones derivatives TH-27, TH-29, TH-33, TH-35) to TcAChE were performed using the FlexX software based on the X-ray crystal structure of TcAChE(-)

*Bộ môn Hóa Dược – Khoa Dược – Đại Học Y Dược TP. Hồ Chí Minh **Trường Đại học Y Dược Huế
Tác giả liên hệ: TS Thái Khắc Minh ĐT: 0909680385 Email: thaikhackminh@gmail.com

Galanthamin complex.

Results: Docking results showed that the isoflavone and aurone derivatives can bind to the central and the peripheral anionic site of AChE concurrently. Besides, the interaction between phenyl moiety of these compounds with Phe290, Phe288, Phe331, and Tyr334 could be their advantage because these amino acids specify the differentiation between acetyl cholinesterase and butyl cholinesterase. So, the new flavonoid derivatives are hoped for effective and selective inhibitors.

Conclusions: Our docking study indicated that there are the strong interaction between isoflavone, aurone and AChE. The information may be useful in design new AChE inhibitors with higher affinity.

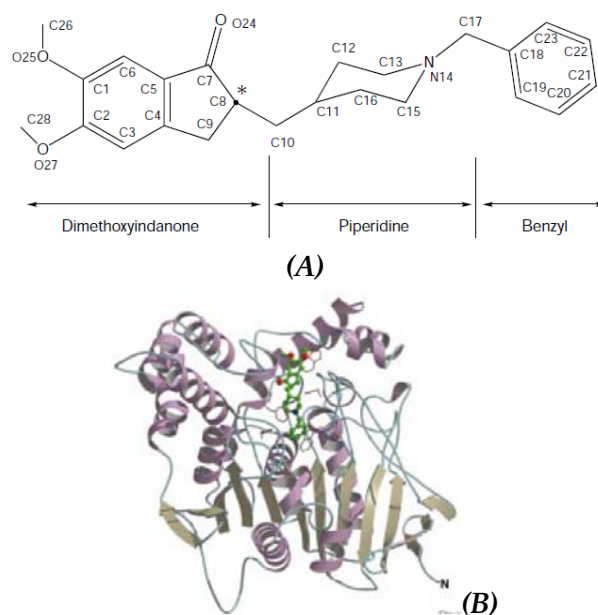
Keywords: docking, acetylcholinesterase, AChE, Alzheimer, flavonoid, aurone.

ĐẶT VẤN ĐỀ

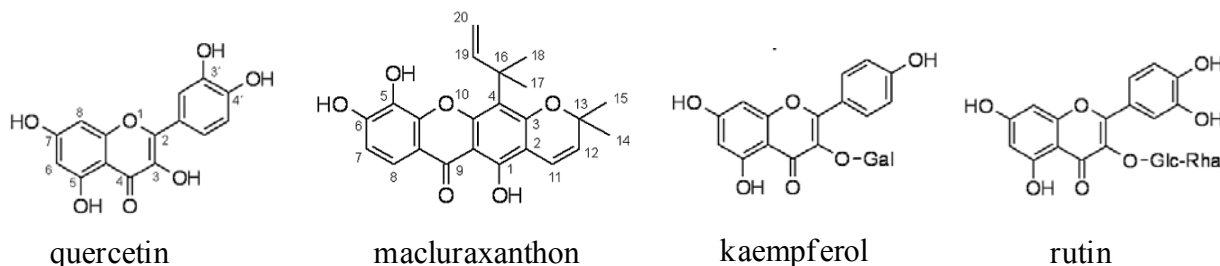
Bệnh Alzheimer (AD), một bệnh gây sa sút trí tuệ hay mất trí nhớ do tổn thương chất xám của vỏ não, hiện là một trong những vấn đề sức khỏe trầm trọng nhất của tuổi già⁽¹⁾ Chất ức chế acetylcholinesterase (AChEI) là nhóm thuốc đầu tiên và phát triển nhất được chấp thuận để điều trị triệu chứng AD⁽¹¹⁾. Trong số các chất AChEI sử dụng trong lâm sàng, donepezil và rivastigmin thể hiện tác dụng rất tốt ở những giai đoạn từ sớm đến trung bình ở bệnh nhân AD với ít tác dụng phụ. Gần đây một số báo cáo đã chứng minh khả năng ức chế acetylcholinesterase (AChE) của các flavonoid (quercetin, macluraxanthon, kaempferol, rutin). Ngoài ra, flavonoid là những hợp chất polyphenol được biết có hoạt tính chống oxy hóa mạnh, đây là lợi điểm của những hợp chất này trong điều trị bệnh Alzheimer.

Trong nghiên cứu này, sự gắn kết của một số hợp chất flavonoid trên AChE bằng mô hình mô tả phân tử docking được thực hiện bằng phần mềm FlexX 3⁽⁵⁾. Các phân tử mới thuộc nhóm flavonoid có tiềm năng ức chế AChE sẽ được đánh giá qua sự gắn kết với cấu trúc không gian

mục tiêu tác động. Kết quả thu được từ nghiên cứu này về quan hệ cấu trúc (isoflavon và auron)- hoạt tính ức chế ACHE có thể ứng dụng trong tổng hợp các dẫn chất flavonoid mới có hoạt tính sinh học tốt hơn.



Hình 1. (A) Donepezil và (B) phức hợp donepezil-TcAChE



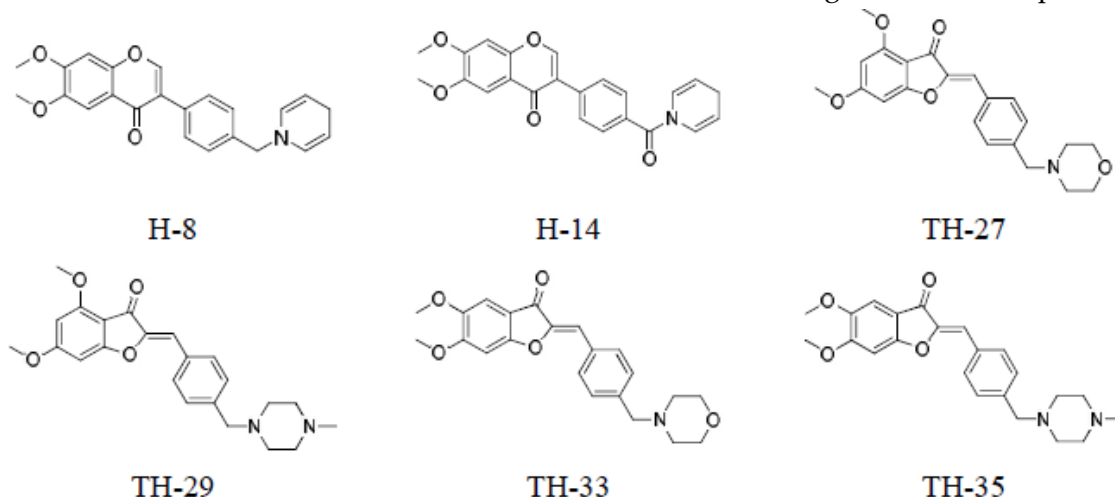
Hình 2. Cấu trúc hóa học quercetin, macluxanthon, kaempferol và rutin

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Cơ sở dữ liệu

Các flavonoid mới bao gồm 2 dẫn chất isoflavon (H-8, H-14) và 4 dẫn chất auron (TH-

27, TH-29, TH-33, TH-35) được dự đoán có tác dụng ức chế AChE có ý nghĩa từ mô hình *in silico* phân loại và dự đoán hoạt tính ức chế AChE⁽⁴⁾ sẽ được nghiên cứu cơ chế tác động ức chế AChE bằng mô hình mô tả phân tử docking.



Hình 3. Các flavonoid mới được dự đoán có tác dụng ức chế AChE từ các mô hình *in silico*

Bảng 1. IC₅₀ dự đoán của các flavonoid mới so với IC₅₀ của tacrin (có được từ thực nghiệm).

	pD ₂ dự đoán	Giá trị hoạt tính quy đổi IC ₅₀ (µM)
Tacrin (chất ức chế đối chiếu)		0,1280
H-8	0,9051	0,1244
H-14	1,2915	0,0511
TH-27	1,4403	0,0363
TH-29	1,4462	0,0342
TH-33	1,4922	0,0322
TH-35	1,5056	0,0312

Cấu trúc tinh thể tia X của AChE

Phức hợp 1DX6 (PDB ID.) của TcAChE(-)-Galanthamin được lựa chọn sử dụng trong nghiên cứu này do độ phân giải tốt (2,3 Å) và đạt yêu cầu về chất lượng của một mô hình tốt (R =0,192 và R tự do=0,235). Cấu trúc 3 chiều này được tải về máy tính từ ngân hàng cơ sở dữ liệu protein⁽⁸⁾.

Chuẩn bị ligand và vùng tác động enzym

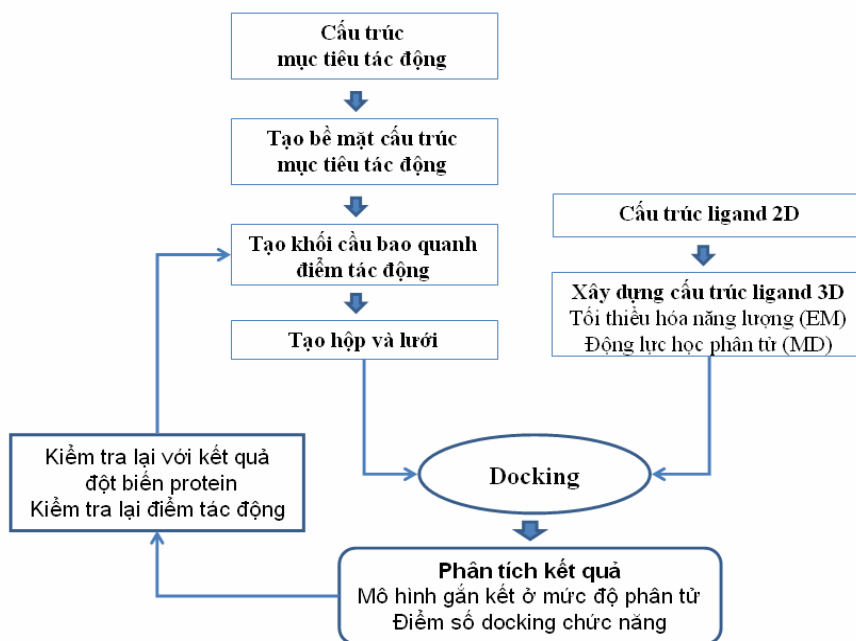
Cấu trúc tinh thể của phức hợp được biểu diễn 3D nhờ phần mềm FlexX 3. Vùng tác động

của protein được xác định dựa trên vị trí ligand và sự hiện diện các acid amin quan trọng. Các phân tử nước được loại bỏ và cấu dạng các acid amin được kiểm tra trước khi tái lập vùng tác động của enzym.

Quá trình chuẩn bị các ligand (H-8, H-14, TH-27, TH-29, TH-33, TH-35) được tiến hành trong SYBYL-X 1.1. Trong giai đoạn này, các cấu trúc 3D của ligand phải được tối thiểu hóa năng lượng, và tiến hành động lực học phân tử nhờ chức năng «*Simulated annealing*» nhằm thu được cấu dạng bền vững nhất trước khi tiến hành docking.

Docking với 1DX6

Tiến trình docking được thực hiện theo sơ đồ dưới đây. Việc *docking* được tiến hành ban đầu với ligand đồng kết tinh (trong trường hợp này là galanthamin) đã được chuẩn bị lại trong SYBYL. Độ lệch RMSD ≤ 1,5 Å so với cấu dạng kết tinh chứng tỏ độ tin cậy của việc dự đoán cơ chế tác động trên các ligand mới.

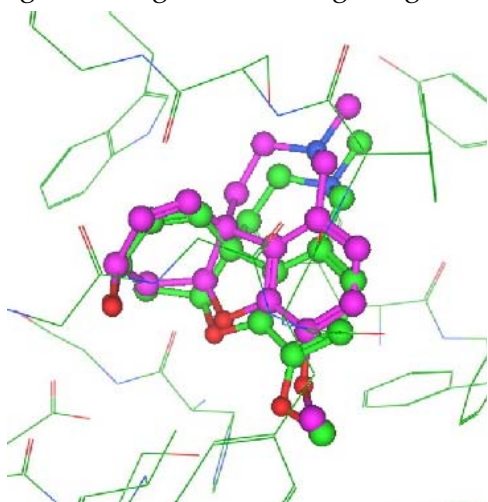


Hình 4. Tiến trình docking

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Docking lại cấu trúc tinh thể

Kết quả docking lại ligand đồng tinh thể của 1DX6 (galanthamin) cho cấu dạng và các tương tác lặp lại trên mô hình tinh thể tia X (Hình 5). RMSD đạt 0,7124 Å (<1,5 Å) chứng tỏ mô hình xây dựng có thể ứng dụng để giải thích các tương tác của ligand mới trong vùng tác động.



Hình 5. Gióng hàng các cấu dạng galanthamin. Phân tử màu nhạt là ligand đồng kết tinh tinh thể, màu đậm là ligand được docking lại

Docking các dẫn chất mới isoflavon và auron

Các mô tả docking trên các phân tử flavonoid mới được dự đoán là có khả năng ức chế AChE cho thấy: với khung cấu trúc isoflavon và auron (Hình 3), tất cả các chất trên đều trải dài dọc theo hẻm tác động và tương tác với đồng thời vùng xúc tác và vùng ngoại biên của enzym (Hình 6 và Hình 8).

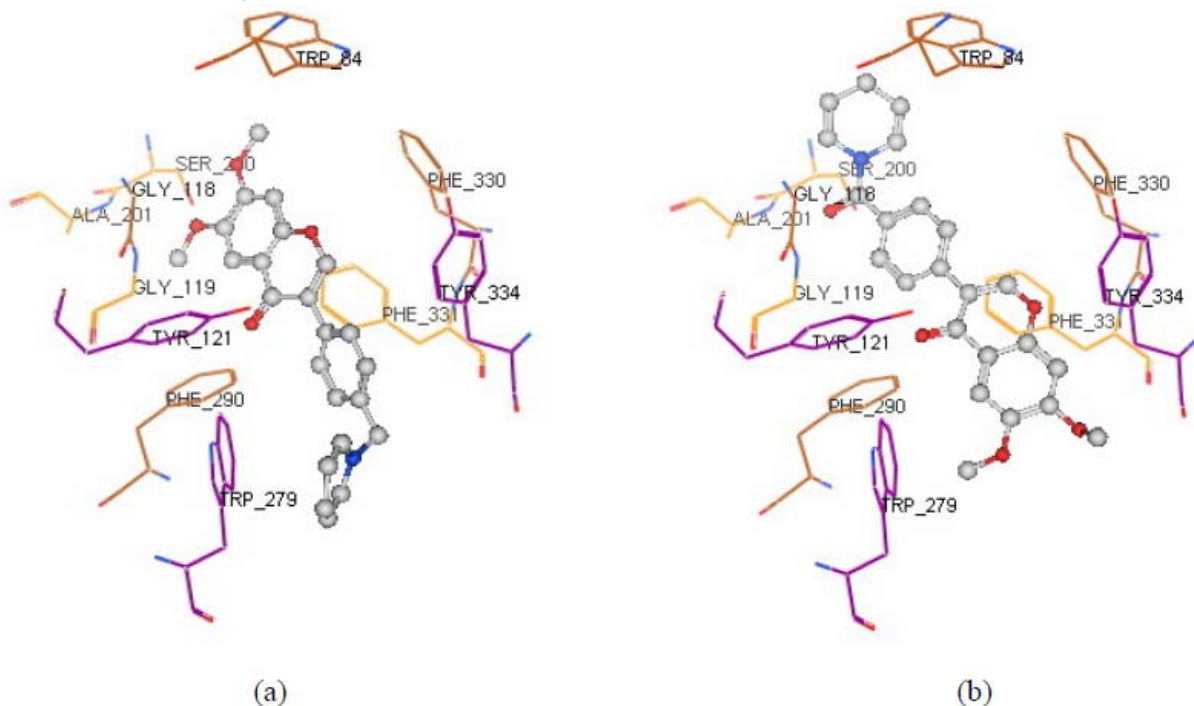
* Trong mô hình mô tả phân tử docking, hai dẫn chất isoflavon cho kết quả khác nhau trên 1DX6 (Hình 6a và 6b):

- Gần đáy của hẻm tác động, phần benzopyranon của H-8 được ổn định nhờ các tương tác kỵ nước với các acid amin thơm như Phe330, Phe331 và Phe290 trong khi phần phenyl tiếp xúc với các acid amin ngoại biên như Tyr121, Tyr334 và Trp279. Đặc biệt, nhóm methoxy hình thành liên kết hydro mạnh với Ser200 (2,31 Å) và một liên kết hydro yếu với Gly118 (3,22 Å), những liên kết này có lẽ đóng vai trò chính trong hoạt tính của phân tử (Hình 6a).

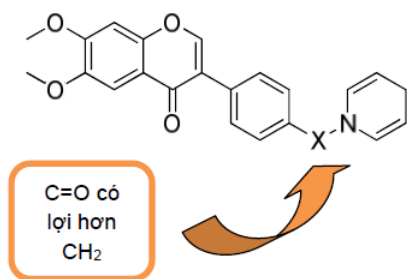
- Trong trường hợp H-14, sự hiện diện của nhóm carbonyl đảo ngược cấu dạng gắn kết so

với H-8. Cấu dạng này thuận lợi cho việc hình thành 4 liên kết hydro giữa nhóm carbonyl với các acid amin của vùng xúc tác gồm Gly118 (2,90 Å), Ala201 (3,11 Å), Gly119 (2,95 Å) và Ser200

(2,43 Å), ngoài các tương tác kỵ nước được quan sát thấy giữa phần nhân thơm của H-14 với AChE (Hình 6b).



Hình 6. Kết quả docking của isoflavon H-8 (a) và H-14 (b) trong vùng tác động của AChE (pdb1DX6). Phân tử isoflavon được định dạng hình que và cấu với nguyên tử nitơ (xanh) và oxy (đỏ)



Hình 7. Biến đổi có lợi về hoạt tính trên khung isoflavon

Hai dẫn chất isoflavon H-8 và H-14 có chung một nhóm thế dihydropyridin, khác nhau ở sự có mặt nhóm carbonyl. Kết quả docking cho thấy sự hiện diện của nhóm carbonyl giúp gắn kết phân tử chặt hơn trên enzym nhờ hình thành 4 liên kết cho-nhận với các acid amin của vùng xúc tác. Điều này cũng phù hợp với kết quả dự đoán hoạt tính của H-14 cao hơn H-8 khoảng 2 lần. Như vậy, có thể việc thay thế nhóm metylen

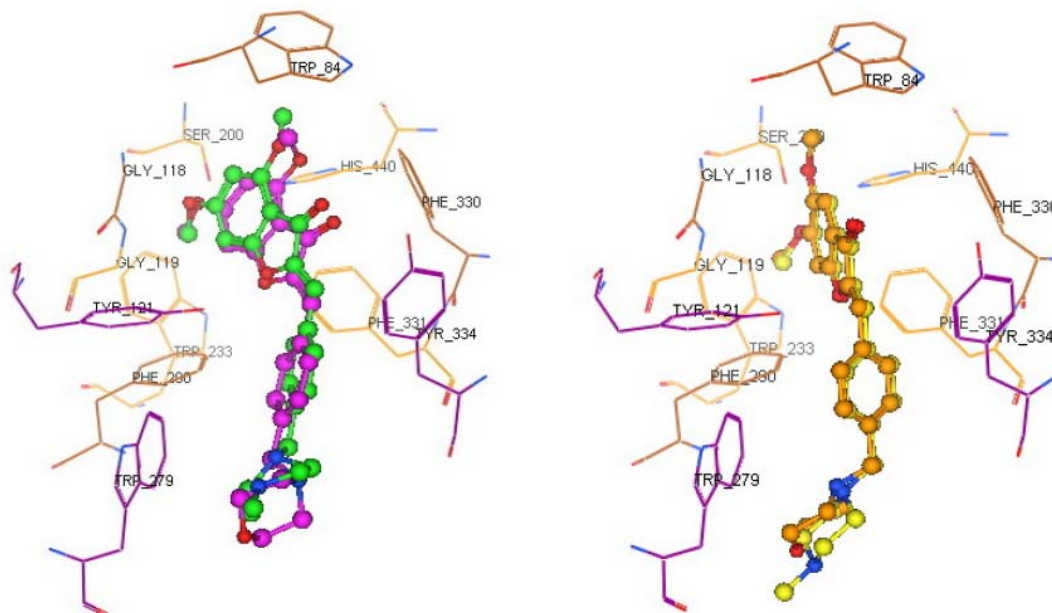
bằng carbonyl liên kết trực tiếp với khung isoflavon sẽ có lợi cho hoạt tính kháng AChE của phân tử (Hình 7).

* Đối với các dẫn chất auron, mô hình mô tả phân tử docking cho thấy cả 4 phân tử đều cho cấu dạng gắn kết và tương tác tương tự. Nhìn chung, phân tử benzofuranon có xu hướng hướng về vùng xúc tác tại đó hình thành các liên kết cho-nhận giữa 1 hoặc 2 nhóm methoxy với Ser200 (TH-27, TH-29, TH-33, TH-35), His440 (TH-33, TH-35) hay Gly119 (TH-27, TH-29). Ngoài các tương tác kỵ nước với các acid amin thơm (như Trp84, Phe330, Phe288, Phe290, Phe331, Trp233, Tyr334), sự hiện diện của N tích điện dương của vòng piperazin và morpholin tạo các liên kết cation- π với Trp279 của vùng ngoại biên (Hình 8).

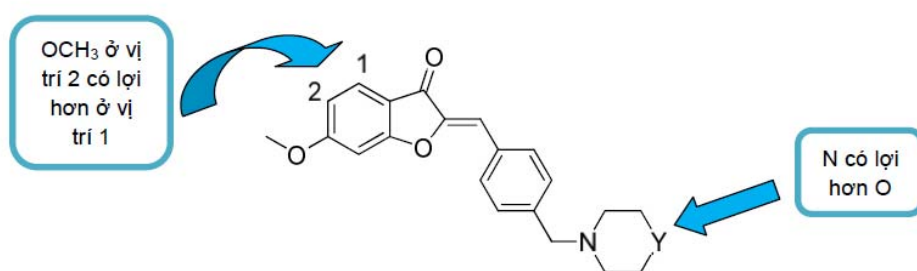
Bốn dẫn chất auron được dự đoán có hoạt tính ức chế AChE đáng kể đều có chung một nhóm thế piperazin (TH-29, TH-35) hoặc

morpholin (TH-27, TH-33). Theo kết quả docking giữa TH-27 và TH-29 cũng như giữa TH-33 và TH-35, vòng piperazin cho gắn kết tốt hơn trên AChE so với morpholin do sự có mặt của 2 nguyên tử N proton hóa (thay vì 1 đối với morpholin) hình thành tương tác cation- π với Trp279 ở vùng ngoại biên. Hơn nữa, nhóm -NH⁺ này có khả năng hình thành liên kết cho nhận mạnh hơn O với acid amin lân cận. Mặt

khác, đánh giá kết quả docking còn cho thấy sự khác nhau giữa 2 nhóm thế dimethoxy trên khung benzofuranon. Vị trí thế ortho dường như có lợi hơn meta do khả năng tạo các liên kết hydro mạnh giữa cả 2 nhóm methoxy (TH-33, TH-35) với acid amin xung quanh thay vì 1 nhóm trong trường hợp meta (TH-27, TH-29). Các nhận xét này có vẻ phù hợp với kết quả dự đoán hoạt tính pD2 (Bảng 1).



Hình 8. Mô hình mô tả phân tử docking của TH-27 (màu hồng), TH-29 (màu xanh), TH-33 (màu cam) và TH-35 (màu vàng) trong cấu trúc tinh thể AChE (pdb 1DX6). Phân tử auron được định dạng hình que và cấu với nguyên tử nitơ màu xanh và oxy màu đỏ.



Hình 9. Các biến đổi về hoạt tính có lợi trên khung auron

KẾT LUẬN

Với sự khám phá ra vai trò thúc đẩy kết tụ các mảng ngoại bào amyloid của AChE tại vùng ngoại biên góp phần tạo nên bệnh Alzheimer, việc tìm kiếm các chất ức chế « kép » có khả năng gắn kết trên cả vùng xúc tác và ngoại biên

là một xu hướng nghiên cứu hiện nay nhằm tăng hiệu quả điều trị bệnh. Các dẫn chất isoflavan và auron nói trên, đặc biệt là các auron, đều cho thấy những tương tác với Trp279, acid amin quan trọng nhất của vùng ngoại biên⁽³⁾, ngoài các tương tác với các acid amin vùng xúc tác. Ngoài ra, sự tương tác của

các phần nhân thơm (phenyl) trong các cấu trúc nói trên với các acid amin như Phe290, Phe288, Phe331, Tyr334 có thể là một ưu điểm cho hoạt tính ức chế enzym, vì các acid amin này là phần khác biệt giữa AChE và butyrylcholinesterase. Vì vậy các dẫn chất mới này được hi vọng sẽ là những chất ức chế hiệu quả hơn và chọn lọc hơn trên AChE.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alzheimer's Association. <http://www.alz.co.uk> (10.07.2010).
2. Cokugras, A. N., (2003). Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance. *Turkish Journal of Biochemistry*, 28: 54-61.
3. Colletier, J.-P. Étude des relations structure-dynamique-fonction au sein de l'acétylcholinestérase. Université Joseph Fourier - Grenoble I, 2006.
4. Dao. T.T.H, Huynh T.N.P, Thai K.M (2010) Modèles *in silico* pour prédire l'activité des inhibiteurs d'acétylcholinestérase. *Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme d'état de pharmacien. Université de médecine et de pharmacie de Hochiminh-ville. Faculté de pharmacie* 2010, 43-44.
5. Docking/FlexX. <http://www.biosolveit.de/FlexX> (10.07.2010);
6. Mahmud THK, Senol F. S., Kartal M., Sener B., Dvorská M., Smejkal K., Slapetová T. (2009). Cholinesterase inhibitory activities of some flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies. *Chemico-Biological Interactions*, 181: 383-389;
7. Philippe B, Chrétien JR., Fortier PL, Coppet L (1999). Automated docking of 82 *N*-benzylpiperidine derivatives to mouse acetylcholinesterase and comparative molecular field analysis with "natural" alignment. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 13: 355-371;
8. Protein Data Bank. <http://www.pdb.org> (10.07.2010)
9. Qiong Xie, Y. T., Wei Li, Xing-Hai Wang, Zhui-Bai Qiu (2006). Investigation of the binding mode of (-)-meptazinol and bis-meptazinol derivatives on acetylcholinesterase using a molecular docking method. *Journal of Molecular Modelling*, 12: 390-397.
10. Rong SYX., Chunqi Hu, Jing Zhang, Xiao Lin, Jingya Li, Bo Yang, Qiaojun He, Yongzhou Hu (2009). Design, synthesis and AChE inhibitory activity of indanone and aurone derivatives. *European journal of medicinal chemistry*, 44: 7-17; (c) Rong Sheng, X. L., Jing Zhang, Kim Sun Chol, Wenhai Huang, Bo Yang, Qiaojun He, Yongzhou Hu (2009). Design, synthesis and evaluation of flavonoid derivatives as potent AChE inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17: 6692-6698.
11. Selkoe, D. J. (2001). Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy. *Physiological Reviews*, 81: 741-766; (b) Paul T. Francis, A. M. P., Micheal Snape, Gordon K. Wilcock (1999). The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 66:137-147; (c) V. Fodale, D. Q., C. Trecroci, V. Caminiti, L. B. Santamaria (2006). Alzheimer's disease and anaesthesia: implications for the central cholinergic system. *British Journal of Anaesthesia*, 97: 445-452.