

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JAN KEUSCHLER

**KVANTNA NARAVA PREPOZNAVANJA LIGANDOV NA HISTAMINSKEM
H₂ RECEPTORJU IN PRIMERJAVA Z VEZAVNIMI LASTNOSTMI ISTIH
LIGANDOV**

**QUANTUM NATURE OF LIGAND–H₂ RECEPTOR BINDING AND
COMPARISON WITH LIGAND BINDING AFFINITIES**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

LJUBLJANA, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljal na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo na Medicinski fakulteti Univerze v Ljubljani in Kemijskem inštitutu v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Mojce Kržan in prof. dr. Janeza Mavrija.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Mojci Kržan in somentorju prof. dr. Janezu Mavriju za strokovno pomoč, konstruktivne nasvete in usmerjanje pri izdelavi naloge.

Posebna zahvala gre družini, ki mi je omogočila študij. Hvala za podporo in razumevanje.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom prof. dr. Mojce Kržan in prof. dr. Janeza Mavrija.

Jan Keuschler

Kazalo vsebine

Kazalo vsebine.....	II
Kazalo enačb	IV
Kazalo preglednic	IV
Kazalo slik	V
Povzetek	VIII
Abstract	IX
Abecedni seznam okrajšav	X
1 Uvod.....	1
1.1 Receptorji.....	1
1.1.1 Receptorji, sklopljeni s proteinom G	2
1.1.2 Histaminski receptorji.....	4
1.2 Ligandi.....	5
1.2.1 Ligandi histaminskega receptorja H ₂	6
1.3 Interakcija receptor-ligand.....	8
1.3.1 Vrste kemijskih vezi	8
1.3.2 Vezavne študije.....	10
1.4 Devteriranje	11
1.5 Računska kemija.....	13
1.5.1 Molekulska grafika.....	13
1.5.2 Molekulska mehanika (MM).....	13
1.5.3 Molekulska dinamika (MD).....	14
1.5.4 Kvantnomehanski pristopi (QM).....	14
1.5.5 Hibridni večnivojski pristopi (QM/MM).....	15
2 Namen dela in delovne hipoteze.....	16
3 Metode in oprema.....	17
3.1 Strojna oprema.....	17
3.2 Programska oprema	18
4 Postopek dela.....	19

4.1 Izračun proste energije hidratacije.....	21
4.2 Izračun proste energije interakcije ligand-receptor	22
4.3 Sprememba proste vezavne energije po devteriranju	24
4.4 Molekulska dinamika.....	25
5 Rezultati in razprava	26
5.1 Prosta energija hidratacije 2- in 4-metil histamina	27
5.2 Prosta energija interakcije 2- in 4-metil histamina z receptorjem.....	31
5.3 Prosta energija vezave 2- in 4-metil histamina	34
5.4 Prosta energija hidratacije cimetidina in famotidina	37
5.5 Prosta energija interakcije cimetidina in famotidina z receptorjem.....	40
5.6 Prosta energija vezave cimetidina in famotidina	44
5.7 Molekulska dinamika.....	45
6 Sklep	49
7 Literatura	50

Kazalo enačb

<i>Enačba 1</i>	8
<i>Enačba 2</i>	8
<i>Enačba 3: Cheng-Prusoff-ova enačba</i>	10
<i>Enačba 4: Sprememba proste vezavne energije po devteriranju</i>	24
<i>Enačba 5: Enačba za izračun spremembe proste energije vezave po devteriranju iz vrednosti pIC₅₀</i>	34

Kazalo preglednic

Preglednica I: Lastnosti, funkcija in nahanje histaminskih receptorjev	4
Preglednica II: Farmakodinamski in farmakokinetični parametri antagonistov histaminskega receptorja H ₂	7
Preglednica III: Uporabljen lokalni računalnik	17
Preglednica IV: Uporabljena gruča računalnikov	17
Preglednica V: Uporabljena programska oprema	18
Preglednica VI: Spremembe proste energije hidratacije, interakcije in vezave po devteriranju za 2-metil histamin	35
Preglednica VII: Spremembe proste energije hidratacije, interakcije in vezave po devteriranju za 4-metil histamin	35
Preglednica VIII: Spremembe proste energije hidratacije, interakcije in vezave po devteriranju za cimetidin	44
Preglednica IX: Spremembe proste energije hidratacije, interakcije in vezave po devteriranju za famotidin	44

Kazalo slik

Slika 1: Shematski prikaz posameznih tipov receptorjev	2
Slika 2: Shema delovanja receptorja, sklopljenega s proteinom G.....	3
Slika 3: Krivulja učinkovitost v odvisnosti od koncentracije polnega, delnega in inverznega agonista ter antagonist.....	5
Slika 4: Strukturne formule agonistov histaminskega receptorja H ₂	6
Slika 5: Strukturne formule antagonistov histaminskega receptorja H ₂	7
Slika 6: Shematska ponazoritev vodikove vezi v primeru vodika in devterija.....	12
Slika 7: Ubbelohdejev efekt; odvisnost energije vezi od dolžine vezi O-H oz. O-D	12
Slika 8: Ponazoritev vplivov na potencialno energijo molekul	14
Slika 9: Primer vhodne datoteke za Gaussian 09 in opis posameznih komponent datoteke.....	20
Slika 10: Uporabniški vmesnik programa Molden	21
Slika 11: Struktura histaminskega H ₂ receptorja z vezanim histaminom	23
Slika 12: POPC – palmitoil oleoil fosfatidilholin	25
Slika 13: TIP3P model vode	25
Slika 14: Uporabljena shema za izračun proste energije hidratacije monokationa 2-metil histamina	27
Slika 15: Dolžina vodikovih vezi v pentameru in dimeru vode pred in po devteriranju	28
Slika 16: Razdalja med donorjem in akceptorjem vodikovega atoma v pentameru in dimeru vode pred in po devteriranju	28
Slika 17: Dolžina vodikovih vezi v sistemu hidratiranega 2-metil histamina pred in po devteriranju	29
Slika 18: Razdalja med donorjem in akceptorjem vodika v sistemu hidratiranega 2-metil histamina pred in po devteriranju	29
Slika 19: Dolžina vodikovih vezi v sistemu hidratiranega 4-metil histamina pred in po devteriranju	30
Slika 20: Razdalja med donorjem in akceptorjem vodikovega atoma v sistemu hidratiranega 4-metil histamina pred in po devteriranju.....	30
Slika 21: Shema za izračun interakcije med 2-metil histaminom in aminokislinskimi ostanki vezavnega mesta receptorja	31
Slika 22: Shema za izračun interakcije med 4-metil histaminom in aminokislinskimi ostanki vezavnega mesta receptorja	32

Slika 23: Dolžina vodikovih vezi v sistemu 2-metil histamina v vezavnem mestu receptorja pred in po devteriranju	32
Slika 24: Razdalja med donorjem in akceptorjem vodika v sistemu 2-metil histamina v vezavnem mestu receptorja pred in po devteriranju	33
Slika 25: Dolžina vodikovih vezi v sistemu 4-metil histamina v vezavnem mestu receptorja pred in po devteriranju	33
Slika 26: Razdalja med donorjem in akceptorjem vodika v sistemu 2-metil histamina v vezavnem mestu receptorja pred in po devteriranju	34
Slika 27: Inhibicija specifično vezanega ³ H-tiotidina s histaminom, 2-metil histaminom in 4-metil histaminom v kulturi astrocitov.....	36
Slika 28: Uporabljen shema za izračun proste energije hidratacije cimetidina	37
Slika 29: Uporabljen shema za izračun proste energije hidratacije famotidina	37
Slika 30: Dolžina vodikovih vezi v sistemu hidratiranega cimetidina pred in po devteriranju	38
Slika 31: Razdalja med donorjem in akceptorjem vodikovega atoma v sistemu hidratiranega cimetidina pred in po devteriranju	38
Slika 32: Dolžina vodikovih vezi v sistemu hidratiranega famotidina pred in po devteriranju	39
Slika 33: Razdalja med donorjem in akceptorjem vodikovega atoma v sistemu hidratiranega famotidina pred in po devteriranju.....	39
Slika 34: Shema za izračun interakcije med cimetidinom in aminokislinskimi ostanki vezavnega mesta receptorja	40
Slika 35: Shema za izračun interakcije med famotidinom in aminokislinskimi ostanki vezavnega mesta receptorja	41
Slika 36: Dolžina vodikovih vezi v sistemu cimetidina v vezavnem mestu receptorja pred in po devteriranju.	41
Slika 37: Razdalja med donorjem in akceptorjem vodikovega atoma v sistemu cimetidina v vezavnem mestu receptorja pred in po devteriranju	42
Slika 38: Dolžina vodikovih vezi v sistemu famotidina v vezavnem mestu receptorja pred in po devteriranju	42
Slika 39: Razdalja med donorjem in akceptorjem vodikovega atoma v sistemu famotidina v vezavnem mestu receptorja pred in po devteriranju	43

Slika 40: Sistem histaminskega receptorja H ₂ v lipidnem dvosloju iz POPC, obdan z vodo.	45
Slika 41: Histaminski H ₂ receptor z vezanim histaminom v lipidnem dvosloju POPC na začetku simulacije (levo) in po 40 ns (desno).....	46
Slika 42: Kvadratni koren povprečnega kvadrata odmikov v nm glede na čas simulacije..	46
Slika 43: Kvadratni koren povprečnega kvadrata odmikov v nm glede aminokislinski ostanek	47
Slika 44: Histaminski H ₂ receptor z vezanim histaminom	47
Slika 45: Radij sukanja v nm glede na čas poteka simulacije.....	48

Povzetek

Histamin je biogeni amin, ki se nahaja v večini človeških tkiv. Je naravni agonist histaminskih receptorjev. Poznamo 4 podtipe histaminskih receptorjev: H₁, H₂, H₃ in H₄. Vsi podtipi histaminskega receptorja spadajo v skupino receptorjev sklopljenih s proteinom G. Kot modelni sistem smo uporabili histaminski H₂ receptor. Njegova primarna struktura je poznana, terciarna pa ne, zato smo uporabili homologni model. Vezavno mesto receptorja so že proučevali z metodo usmerjene mutageneze in prav tako z računalniškimi metodami – molekulsko dinamiko. Kot vsi s proteinom G sklopljeni receptorji, je histaminski receptor H₂ sestavljen iz sedmih transmembranskih alfa vijačnic, vezavno mesto pa se nahaja med temi vijačnicami znotraj lipidnega dvosloja celične membrane. Za naše kvantno-kemijske račune smo uporabili pet aminokislinskih ostankov znotraj vezavnega mesta: Asp⁹⁸, Lys¹⁷⁵, Asp¹⁸⁶, Thr¹⁹⁰ in Tyr²⁵⁰.

Po inkubaciji receptorja v devterijevem oksidu (D₂O), se atomi vodika na elektronegativnih elementih zamenjajo za atome devterija, kar povzroči spremembo dolžine inter- in intramolekularnih vezi ter tako spremembo v afiniteti liganda do histaminskega H₂ receptorja. Prav tako devteriranje vpliva na stabilnost proteina in topnost.

V magistrskem delu smo izračunali spremembo proste vezavne energije in afinitete 2-metil histamina, 4-metil histamina, cimetidina in famotidina na histaminski H₂ receptor po devteriranju. Opazovali smo tudi vpliv devteriranja na dolžino intra- in interatomskih vezi. Tako smo pokazali pomembnost vodikove vezi pri vezavi liganda na histaminski H₂ receptor.

Ključne besede: histaminski H₂ receptor, devteriranje, vodikova vez, prosta vezavna energija, Ubbelohdejev efekt

Abstract

Histamine is a biogenic amine, that is present in most tissues. It is the native ligand for histamine receptors. There are 4 known histamine receptor subtypes: H₁, H₂, H₃ in H₄. All subtypes are a part of the G protein-coupled receptor family.

As a model system we used the histamine H₂ receptor. Its primary structure is known, but not the tertiary structure, therefore we used a homology model. The binding site of the receptor was studied by using directed mutagenesis and computational methods i.e. molecular dynamics. Like all G protein-coupled receptors, the histamine H₂ receptor consists of seven transmembrane alpha helices. The binding site is located between these helices inside the membrane. For our quantum-chemical calculations we used five amino acid residues inside the binding site: Asp⁹⁸, Lys¹⁷⁵, Asp¹⁸⁶, Thr¹⁹⁰ in Tyr²⁵⁰.

After incubation of the receptor in deuterium oxide (D₂O), the hydrogen atoms, bound to electronegative elements, are replaced with deuterium atoms, which leads to a change in inter- and intramolecular bond lengths and also a change in affinity of a ligand to the histamine H₂ receptor. Deuteration also affects protein stability and solubility.

In this thesis, we calculated the change of binding free energy and affinity of 2-methylhistamine, 4-methylhistamine, cimetidine and famotidine to the histamine H₂ receptor upon deuteration. We also observed the effect of deuteration on the length of intra- and interatomic bonds. We have shown the importance of hydrogen bonding in binding of a ligand to the histamine H₂ receptor.

Keywords: histamine H₂ receptor, deuteration, hydrogen bond, binding free energy, Ubbelohde effect

Abecedni seznam okrajšav

Asp ¹⁸⁶	aspartat na mestu 186
Asp ⁹⁸	aspartat na mestu 98
ATP	adenozin-5'-trifosfat
cAMP	3',5'-ciklični adenozin monofosfat
CPCM	reakcijsko polje topila
CŽS	centralni živčni sistem
D	devterij
D ₂ O	devterijev oksid, težka voda
DAG	diacilglicerol
DFT	teorija gostotnih funkcionalov (angl. <i>density functional theory</i>)
DNK	deoksiribonukleinska kislina
GDP	gvanozin-5'-difosfat
GPCR	receptor sklopljen s proteinom G (angl. <i>G protein-coupled receptor</i>)
GTP	gvanozin-5'-trifosfat
H	vodik
HF	Hartree-Fock
HRE	elementi za hormonski odgovor
IP ₃	inozitol 1,4,5-trifosfat
Lys ¹⁷⁵	lizin na mestu 175
MD	molekulska dinamika
MM	molekulska mehanika
PIP ₂	fosfatidilinozitol 4,5-bifosfat
POPC	palmitoil oleoil fosfatidilholin
QM	kvantna mehanika
RGS	regulator signalizacije proteina G
RMSD	kvadratni koren povprečnega kvadrata odmikov (angl. <i>root mean square deviation</i>)
SAR	odnos med strukturo in aktivnostjo (angl. <i>structure-activity relationship</i>)
Thr ¹⁹⁰	treonin na mestu 190
Tyr ²⁵⁰	tirozin na mestu 250

1 Uvod

1.1 Receptorji

Receptorji so beljakovine, ki se nahajajo v celični membrani (transmembranski receptorji) ali v citoplazmi oz. nukleoplazmi (jedrni receptorji). Njihova naloga je prepoznavanja kemijskih signalov in na le-te odgovoriti. Področje, kamor se veže ligand, imenujemo vezavno mesto receptorja (1).

Glede na zgradbo in delovanje, poznamo štiri tipe receptorjev:

Tip 1: Ionotropni receptorji

Strukturno so podobni ionskim kanalčkom. Ionotropni receptorji so sestavljeni iz petih oz. štirih podenot, ki obdajajo transmembransko poro in za razliko od ionskih kanalov, imajo ionotropni receptorji še vezavno mesto za ligand. Ob vezavi agonista na vezavno mesto, se pora odpre in poveča se prehodnost za določeno vrsto ionov (selektivnost) (2).

Tip 2: Receptorji, sklopljeni s proteinom G (GPCR)

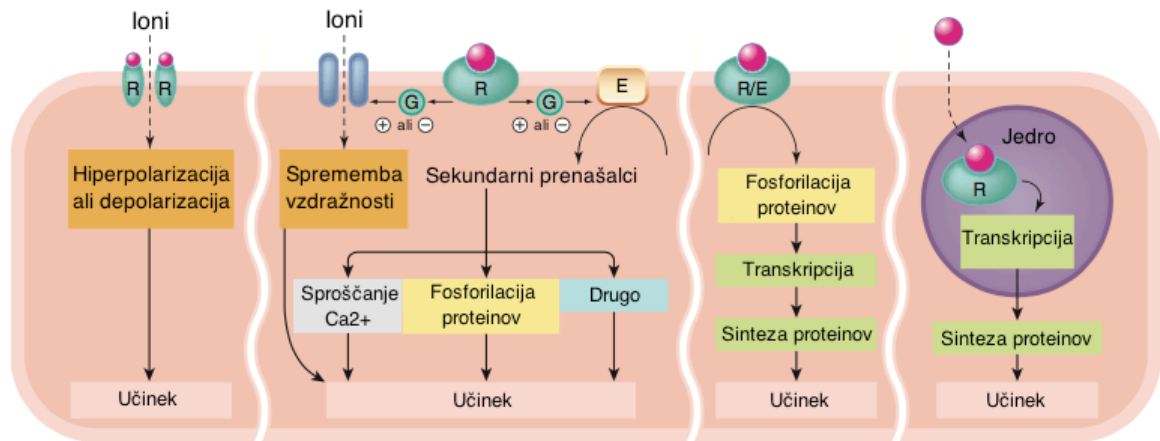
Podrobnejši opis receptorjev, sklopljenih s proteinom G je podan v poglavju 1.1.1.

Tip 3: Receptorji, sklopljeni s kinazo

Sestavljeni so iz izvencelične domene, ki vsebuje vezavno mesto, transmembranske vijačnice in znotrajcelične domene. Na to vrsto receptorja delujejo predvsem proteinski oz. peptidni ligandi (npr. citokini in rastni hormoni), ki z vezavo na vezavno mesto povzročijo aktivacijo kinaze in s tem fosforilacijo proteinov v citosolu (2).

Tip 4: Jedrni receptorji

So monomerni proteini, ki se nahajajo v citosolu oz. celičnem jedru. Po vezavi liganda, se kompleks ligand-receptor veže na elemente za hormonski odgovor (HRE) in deluje kot transkripcijski faktor. Primeri ligandov jedrnih receptorjev so steroidni in ščitnični hormoni. So edini receptorji, ki delujejo neposredno na DNK (2).



Slika 1: Shematski prikaz posameznih tipov receptorjev. Od leve proti desni: ionotropni receptor, GPCR, receptor, sklopljen s kinazo in jedrni receptor (prirejeno po 2).

1.1.1 Receptorji, sklopljeni s proteinom G

Struktura

Receptorje, sklopljene s proteinom G sestavlja ena polipeptidna veriga iz 350-1100 aminokislinskih ostankov, ki so organizirani v 7 transmembranskih α -vijačnic, izvencelično domeno na N koncu in znotrajcelično domeno na C koncu. Ti dve domeni sta lahko različnih dolžin. Glede na velikost domene na N koncu delimo GPCR na 3 družine (2):

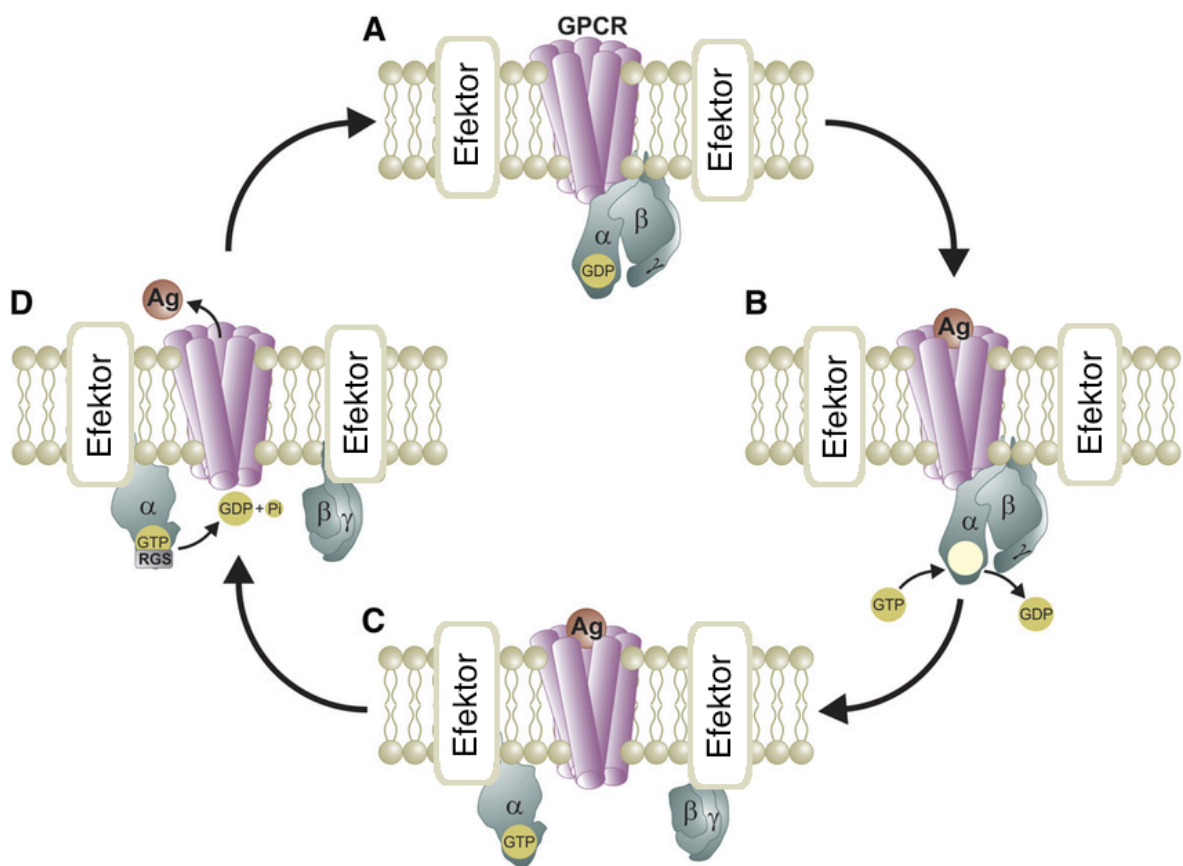
- Rodopsinu podobni receptorji (npr. monoaminski receptorji)
- Družina sekretinskih receptorjev (npr. receptorji za peptidne hormone kot so glukagon in kalcitonin)
- Metabotropni glutamatni receptorji (npr. mGluR in GABA_B receptorji)

Protein G

Protein G se veže na tretjo znotrajcelično zanko GPCR. Njegova naloga je prepoznati aktivacijo receptorja. Sestavljen je iz podenot α , β in γ . Glede na funkcijo podenote α poznamo 4 tipe proteina G – G_s, G_i, G_o in G_q. Na podenoto α je vezana molekula GDP, ki se ob aktivaciji GPCR zamenja za molekulo GTP iz citoplazme, protein G pa disociira na podenoti α -GTP in $\beta\gamma$ – ti dve podenoti sta aktivni obliki proteina G in delujeta na različne efektorje. Regulatorji signalizacije preko G proteina (RGS) so proteini, ki regulirajo delovanje GTPaze. Ko GTP na α podenoti s pomočjo GTPaze hidrolizira v GDP, α podenota disociira od efektorja in se poveže nazaj s kompleksom $\beta\gamma$ ter tako receptor preide v mirovno stanje (2).

Efektorji proteina G

- Adenilat ciklaza; katalizira nastanek cAMP iz ATP
- Fosfolipaza C; katalizira nastanek inozitol trifosfata (IP₃) in diacilglicerola (DAG) iz fosfatidilinozitola bisfosfata (PIP₂)
- Rho A/Rho kinaza; uravnavanje celične proliferacije, krčenje mišičnih vlaken, itd.
- Z mitogenom aktivirana protein kinaza; uravnavanje celičnih funkcij, med drugim deljenje
- Ionski kanalčki; regulacija predvsem kalcijevih in kalijevih ionskih kanalčkov



Slika 2: Shema delovanja receptorja, sklopljenega s proteinom G. Vezava agonista (Ag) povzroči konformacijsko spremembo proteina G in zamenjavo GDP za GTP na α podenoti (B). Protein G nato disociira na α -GTP in $\beta\gamma$ podenoti, ki delujeta na razne efektorje (C). Po hidrolizi GTP v GDP in fosfat ter disociaciji agonista iz receptorja (D), se receptor vrne v neaktivno obliko (A) (prirejeno po 3).

1.1.2 Histaminski receptorji

Poznamo 4 podtipe histaminskih receptorjev. Kljub sorazmerno majhni homologiji, je vsem je skupno, da so sklopljeni s proteinom G in da je naravni ligand histamin. Glavne značilnosti histaminskih receptorjev so povzete v preglednici I.

Preglednica I: Lastnosti, funkcija in nahanje histaminskih receptorjev (prirejeno po 6)

<i>Receptor</i>	H_1	H_2	H_3	H_4
<i>Število aminokislinskih ostankov</i>	487	359	455	390
<i>Nahajanje</i>	Pljuča, ožilje, CŽS	Srce, želodec, CŽS	Centralno in periferno živčevje	Mastociti, eozinofilci
<i>Prenos signala</i>	$G_{q/11}$ ($IP_3/DAG \uparrow$)	G_s (cAMP \uparrow)	G_i (cAMP \downarrow)	G_i (cAMP \downarrow)
<i>Fiziološki učinek</i>	Krčenje gladkih mišic, vazodilatacija, povečanje prepustnosti žil emetični učinek, uravnavanje budnosti	Izločanje želodčne kisline, pozitivni kronotropni in inotropni učinek	Uravnavanje budnosti, hranjenje	Kemotaksa, kognicija
<i>Uporaba</i>	Alergijske reakcije	Ulkusna bolezen	Kognitivne motnje, debelost	Vnetje
<i>Selektivni agonist</i>	N-metil histaprodifen	Amtamin	Imetridin	VUF-8430
<i>Selektivni antagonist</i>	Klorfenamin	Tiotidin	Klobenpropit	JNJ-7777120

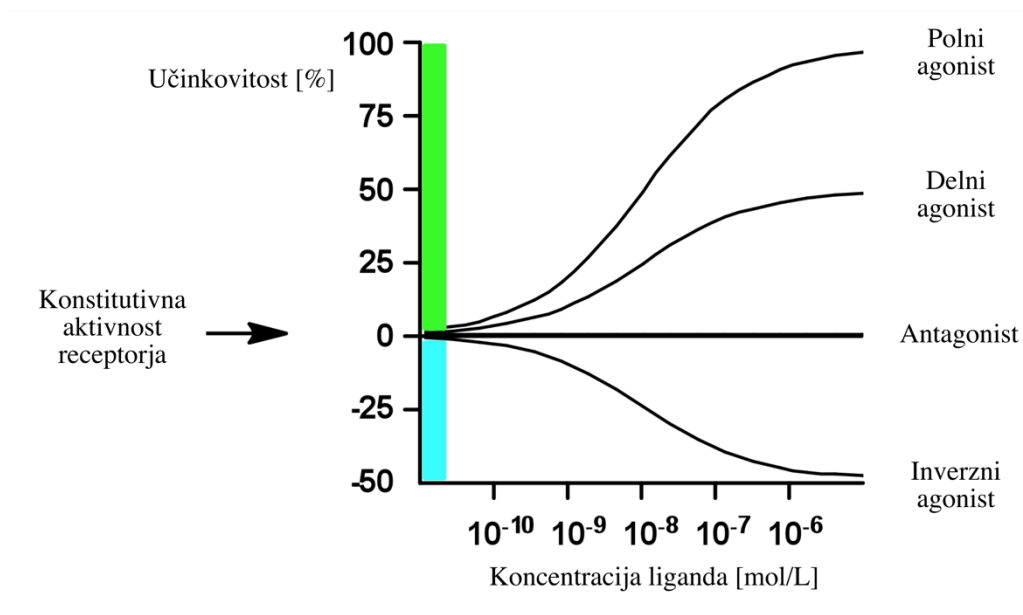
1.2 Ligandi

Ligand je spojina, ki se veže na biološko makromolekulo in z njo tvori kompleks (1). Sposobnost liganda, da se veže na receptor imenujemo afiniteta, sposobnost, da izzove biološki učinek pa učinkovitost (1).

Agonisti ob vezavi na vezavno mesto receptorja sprožijo spremembo v celični funkciji in tako biološki odziv. Jakost agonistov je odvisna od afinitete in učinkovitosti. Polni agonisti razvijejo polni učinek v primeru delnih agonistov pa je učinkovitost manjša.

Antagonisti imajo učinkovitost nič, zato ob vezavi ne pride do biološkega učinka. Tipično je njihova afiniteta večja v primerjavi z agonisti.

Inverzni agonisti zavrejo konstitutivno aktivnost receptorja (učinkovitost je negativna) in so tako sposobni ustvariti učinek, ki je nasproten učinku ob vezavi agonista.



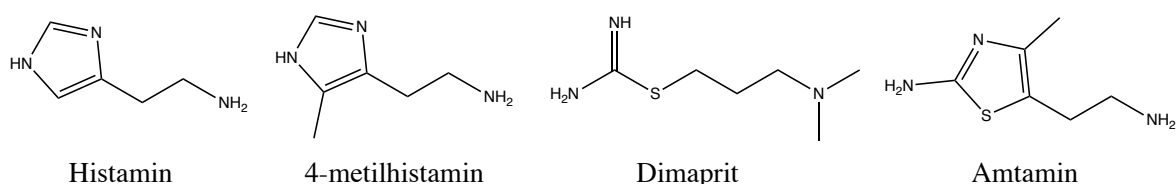
Slika 3: Krivulja učinkovitost v odvisnosti od koncentracije polnega, delnega in inverznega agonista ter antagonista (prirejeno po 4)

1.2.1 Ligandi histaminskega receptorja H₂

Agonisti

Naravni agonist histaminskega receptorja H₂ je histamin. Histamin je biogeni amin, ki je prisoten v večini tkiv – v večjih količinah se nahaja v pljučih, prebavilih in koži. Približno 90 % vsega histamina je shranjenih v granulah v mastocitih oz. tkivnih bazofilcih, ostanek pa se nahaja v enterokromafinim podobnih celicah v želodcu, bazofilnih granulocitih (bazofilcih) v krvi in histaminergičnih nevronih v možganih. Sprošča se ob poškodbi tkiva oz. ob vnetju ter iz presinaptičnih nevronov kot neurotransmitter (2).

Kot prvi selektivni agonist histaminskega receptorja H₂ je v literaturi opisan 4-metil histamin, ki je z etilaminsko skupino in imidazolnim obročem podoben histaminu. Nadaljnja agonista brez imidazolne skupine sta dimaprit in amtamin (Slika 4). Dolgo časa je veljalo, da je za aktivacijo receptorja potrebna tautomerizacija imidazolnega obroča, a aktivacija receptorja z dimapritom in amtaminom kaže na drugačen model aktivacije (5).



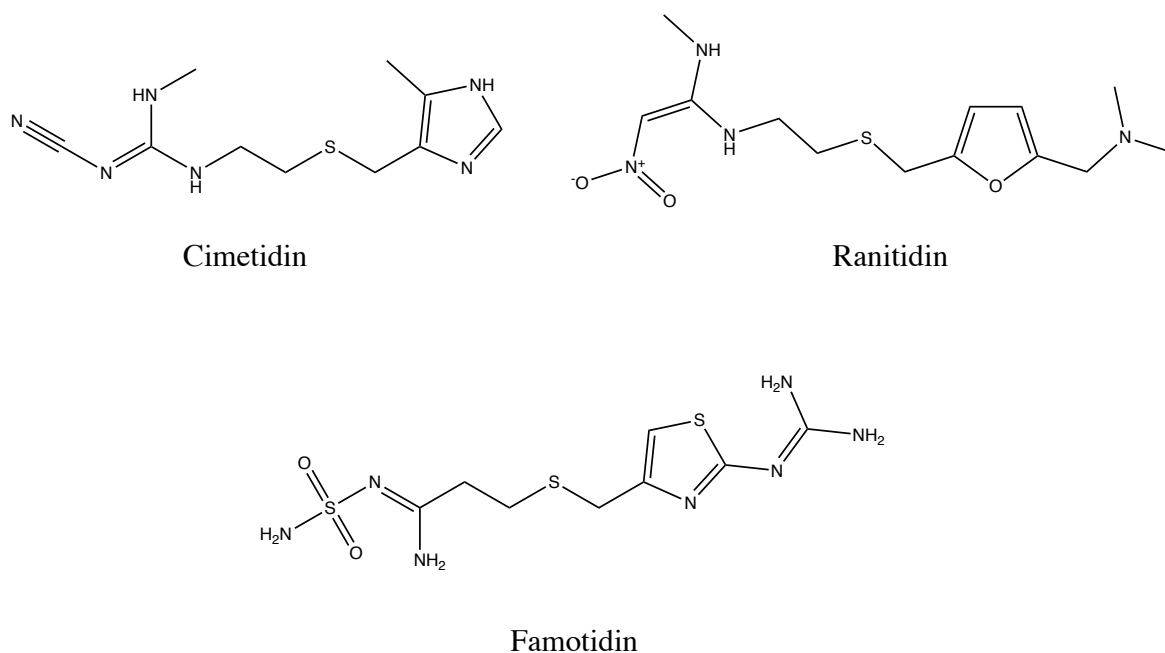
Slika 4: Strukturne formule agonistov histaminskega receptorja H₂

Antagonisti

Antagonisti histaminskega receptorja H₂ delujejo predvsem na receptorje H₂ parietalnih celic v želodcu in tako zmanjšajo izločanje klorovodikove kisline v želodec. Uporabljajo se za zdravljenje gastrointestinalnih boleznih povezanih s prekomernim izločanjem želodčne kisline, npr. refluksni ezofagitis, peptična razjeda in dispepsija. Njihovo predpisovanje se je z uvedbo inhibitorjev protonske črpalke zmanjšalo (6).

Prototip antagonista H₂ je kompetitivni antagonist cimetidin, ki je zaradi interakcij z drugimi zdravili (inhibitor nekaterih citokromov P450) in estrogenskega učinka inferioren v

primerjavi z novejšimi učinkovinami, kot sta npr. ranitidin in famotidin. Razmerje med strukturo in delovanjem (SAR) antagonistov H_2 je sledeče: sestavljeni so iz heteroaromatskega obroča, gibljivo verigo s tioetrsko vezjo in nenabite polarne skupine (cianogvanidinska, diaminonitroetenska ali sulfonamidna skupina) (6). Slednje imajo lahko različna protonacijska stanja, kar povečuje kompleksnost vezave.



Slika 5: Strukturne formule antagonistov histaminskega receptorja H_2

Preglednica II: Farmakodinamski in farmakokinetični parametri antagonistov histaminskega receptorja H_2 (prirejeno po 6)

	<i>Cimetidin</i>	<i>Ranitidin</i>	<i>Famotidin</i>
<i>Biološka uporabnost [%]</i>	60 – 80	50 – 60	40 – 50
<i>Razpolovni čas [h]</i>	2 – 2,5	2,5 – 3	3 – 3,5
<i>Vezava na plazemske proteine [%]</i>	~ 20	10 – 19	15 - 22
<i>IC₅₀ [ng/mL]</i>	500 – 600	100 – 200	20 – 30
<i>Zaviranje kisline na 24 ur [%]</i>	60	70	70
<i>Relativni učinek na citokrome P450</i>	1	0,1	0
<i>Izločanje skozi ledvice [%]</i>	60 – 70	60 – 70	65 – 70

1.3 Interakcija receptor-ligand

Vezava liganda na receptor je prvi in ključni korak za doseganje farmakodinamskega učinka. Za vezavo liganda je pomembna jakost vezi, sorazmerje med energijo vezi in razdaljo ter aditivnost posameznih energij. Interakcijo med receptorjem in ligandom opišemo s prosto energijo interakcije, ΔG , ki je povezana z ravnotežno konstanto K :

$$\Delta G^\circ = -R T \ln K \quad (\text{Enačba 1})$$

pri čemer sta R plinska konstanta in T temperatura.

Energija interakcije, ΔG , je odvisna od prispevkov različnih energijskih faktorjev, izraženih kot sprememba entalpije, ΔH , in obravnave strukturnih fluktuacij, izražene kot sprememba entropije, ΔS :

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (\text{Enačba 2})$$

Sprememba entalpije je odraz kovalentnih, ionskih, vodikovih in van der Waalsovih vezi ter dipolnih interakcij, sprememba entropije pa je odraz izgube rotacijskih in translacijskih prostostnih stopenj.

1.3.1 Vrste kemijskih vezi

Kovalentna vez

Kovalentna vez sestoji iz elektronskega para, ki ga delita dva atoma. Kovalentne vezi določajo specifično geometrijo molekule. So najmočnejši tip kemijskih vezi in se praviloma ne pojavi pri interakciji ligand-receptor, saj so ireverzibilne. Energija takšne vezi je 50 do 200 kcal/mol (7).

Ionska vez

Ionska vez nastane zaradi elektrostatske privlačnosti med dvema nasprotno nabitima delcema. Sila vezi pada z razdaljo v skladu s Coulombovim zakonom. Elektrostatsko polje okoli iona je sferično, zato usmerjenost pri ionski vezi ni pomembna. V plinski fazi je jakost take vezi ekvivalentna kovalentni vezi, v polarni okolici pa se znatno oslabi. Energija take vezi je v proteinski okolici od 0,1 do 10 kcal/mol (7).

Vodikova vez

Atom vodika, kovalentno vezan na donorski atom, je sposoben tvoriti t.i. vodikovo vez z akceptorskim atomom, pri čemer morata donor in akceptor biti dovolj elektronegativna (po navadi O, N, S in F). Nastane zaradi manjše gostote elektronov na vodiku (delni naboj δ^+) in večje gostote elektronov na atomu akceptorju (delni naboj δ^-). Energija vodikove vezi je odvisna od orientacije – najugodnejši je kot med 150° do 180° . Tako kot ionska vez je vodikova vez pretežno elektrostatska (7).

van der Waalove interakcije

Če se dve molekuli dovolj približata, nastane šibka nespecifična privlačna sila, t.i. van der Waalova interakcija. Je posledica naključne fluktuacije elektronov v atomu, kar povzroči nastanek naključnega nihanja prehodnega dipolnega momenta. Energija van der Waalove interakcije je do 1 kcal/mol, ampak ta vrednost hitro pada z večanjem razdalje. Za razliko od ionske in vodikove vezi je tovrstna interakcija neodvisna od dielektrične okolice. Perturbacijska teorija pokaže, da disperzijska energija pada sorazmerno s šesto potenco razdalje (7).

Hidrofobne interakcije

Ko so nepolarne skupine izpostavljene vodnemu (fiziološkemu) mediju, molekule vode niso sposobne hidratirati te skupine, zato se pravilno organizirajo okoli nje. Ker je taka organizacija vode entropijsko neugodna, se nepolarne skupine združujejo s ciljem, da bi se zmanjšala površina stika z vodo. Ta pojav imenujemo hidrofobne interakcije in so osnova za nastanek bioloških membran in terciarne strukture proteinov. Energija take interakcije je od 0,5 do 1 kcal/mol. Hidrofobna interakcija je kompleksen kumulativni efekt vodikovih vezi in van der Waalovih interakcij (7).

1.3.2 Vezavne študije

Z vezavnimi študijami proučujemo vezavo ligandov na receptor. Za to po navadi uporabljamo radioaktivno oz. fluorescenčno označen ligand. Z vezavnimi študijami določamo maksimalno gostoto vezavnih mest ter afiniteto posameznih ligandov do vezavnega mesta na receptorju. Za uspešnost vezavne študije je pomembno, da ločimo med količino liganda, ki je vezan na želen receptor in tako sposoben biološkega učinka (specifična vezava), in količino liganda, ki je vezan na druge strukture, npr. na druge beljakovine v celični membrani in steno posode (nespecifična vezava) (8).

Saturacijski poskusi

Saturacijska vezavna študija sestoji iz merjenja celokupne in nespecifične vezave radioaktivno označenega liganda. Specifična vezava je razlika med celokupno in nespecifično vezavo. Celokupno vezavo merimo z radioaktivno označenim ligandom v odsotnosti »hladnega« liganda (antagonist, ki ni radioaktivno označen) v ravnotežnem stanju pri različnih koncentracijah. Nespecifično vezavo merimo v prisotnosti visoke koncentracije hladnega liganda ($100 \times K_D$). Hladni ligand zasede specifična vezavna mesta, z radioaktivno označenim ligandom pa izmerimo nespecifično vezavo. Tako iz grafa specifične vezave lahko razberemo maksimalno število vezavnih mest (B_{max}) in ravnotežno konstanto kompleksa ligand-receptor (K_D) (8).

Inhibicijski poskusi

V vezavnih študijah inhibicije z agonisti oz. antagonistu v različnih koncentracijah izpodrivamo radioaktivno označen ligand z vezavnega mesta. Tako lahko kvantitativno določimo afiniteto preiskovanega liganda, izraženo z IC_{50} . Ta vrednost nam pove koncentracijo preiskovanega liganda, ki je potrebna, da izpodrine 50% radioaktivno označenega liganda. Prav tako lahko izračunamo disociacijsko konstanto kompleksa inhibitor-receptor (K_i) po enačbi 3 (8).

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_m}}$$

Enačba 3: Cheng-Prusoff-ova enačba

Kinetični poskusi

V kinetičnih poskusih opazujemo vezavo radioliganda v odvisnosti od časa. Na ta način lahko preverimo čas potreben za doseganje ravnotežja in potrdimo reverzibilnost vezave (pri ireverzibilni vezavi ni stanja ravnotežja). Kinetični poskusi so posebej uporabni za proučevanje vpliva alosteričnih modulatorjev na vezavo (8).

1.4 Devteriranje

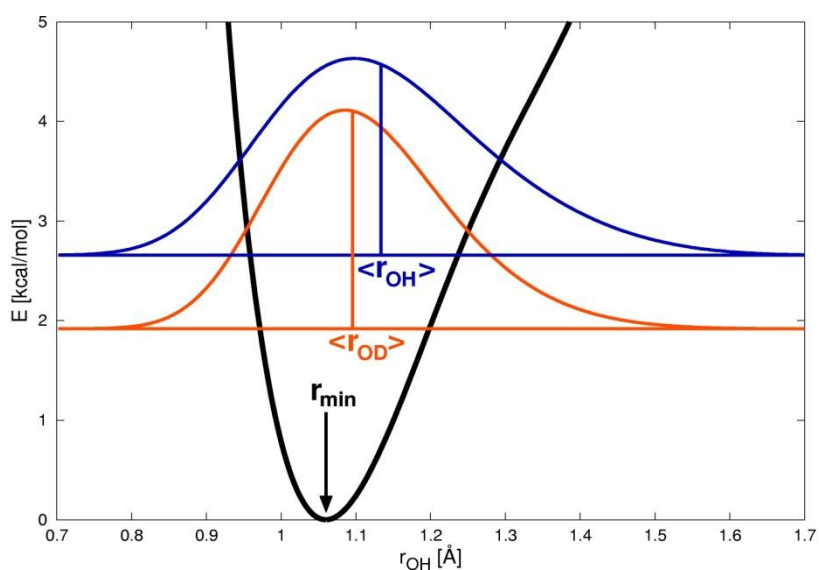
Atome, ki imajo v jedru enako število protonov (enako vrstno število), a različno število nevtronov (različno masno število), imenujemo izotopi. Vodik ima tri naravne izotope in sicer ^1H (vodik oz. protij, H), ^2H (devterij, D) in ^3H (tritij, T). Medtem ko sta vodik in devterij stabilna, je tritij radioaktiven in ima razpolovni čas približno 12 let. Poznamo še umetno pripravljene izotope vodika s 4, 5, 6 ali 7 nevtroni, ampak so nestabilni in imajo razpolovni čas manj kot 10^{-21} sekunde (9).

Devteriranje je proces pri katerem se ^1H vodikovi atomi zamenjajo za atome devterija. V primeru inkubacije proteinov v devterijevem oksidu oz. težki vodi (D_2O) se zamenjajo ^1H atomi za D atome na elektronegativnih atomih (O, N, S), ^1H atomi vezani na ogljikove atome se ne zamenjajo. Vodikova vez je ključna za strukturo vode, proteina in prav tako same vezave liganda na receptor. Udeležba lahkega vodikovega atoma v vodikovi vezi ima znaten nuklearni kvantni značaj, zato je potrebna kvantna obravnava gibanja vodikovega jedra, ki je odvisna od njegove mase. Ob zamenjavi protona za devteron, se zmanjša amplituda valovne funkcije, saj ima devteron maso 2 v primerjavi z maso 1 protona. Posledično je dolžina vezi med donorjem in devterijem krajša v primerjavi z dolžino vezi donorja in vodika (Slika 6). Ta pojav imenujemo Ubbelohdejev efekt (10, 11).

Glede na to, da vodikova vez znatno prispeva k stabilnosti bioloških makromolekul, njihovi strukturi ter vezavi ligandov, z devteriranjem spremenimo le-te lastnosti. Tako se v primeru vezave liganda na receptor z devteriranjem spremeni vezavna afiniteta in posledično funkcijska sposobnost receptorja. To lahko izkoristimo za študijo mehanizma vezave liganda in pomen vodikovih vezi v tem procesu.



Slika 6: Shematska ponazoritev vodikove vezi v primeru vodika in devterija. Vez N-D je za 2,3 % krajša v primerjavi z vezjo N-H, posledično pa je razdalja med dušikom in kisikom večja. Zaradi manjše razdalje med vodikom in kisikom, je vodikova vez v primeru devterija šibkejša (11).



Slika 7: Ubbelohdejev efekt; odvisnost energije vezi od dolžine vezi O-H oz. O-D. Energija ničelne točke (ang. *zero-point energy*) je najnižja energija, ki jo lahko ima kvantnomehanski sistem. Je posledica nihanja kvantnih polj v skladu s Heisenbergovim načelom nedoločenosti (13). Zaradi nižje energije ničelne točke, je vez O-D krajša od vezi O-H in posledično stabilnejša (11).

1.5 Računska kemija

Računska kemija je veja kemije, ki s pomočjo učinkovitih računalniških programov, uporablja metode teoretične kemije za reševanje kemijskih problemov. Računalniške simulacije nam omogočajo proučevanje sistemov, katerih kompleksnost presega zmožnosti analitičnih metod. Poleg tega, nam omogočajo primerjavo z eksperimentalnimi metodami in tako validacijo modelov. Uporablja se predvsem pri oblikovanju novih zdravilnih učinkovin in materialov (14).

1.5.1 Molekulska grafika

Molekulska grafika se ukvarja s proučevanjem molekul in njihovih lastnosti s pomočjo grafične ponazoritve. Prikaz modelov in atomov, nam omogoča vizualizacijo rezultatov izračunov.

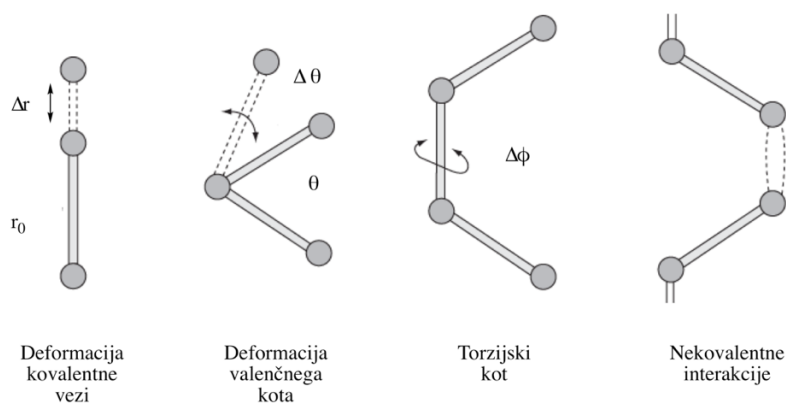
Za prikaz molekul program z grafičnim uporabniškim vmesnikom potrebuje tekstovni zapis molekule. Primeri formatov tekstovnega zapisa so pdb, mol, mol2, itd. Nekateri tekstovni formati vsebujejo tudi podatke o povezanosti atomov in tipih vezi, če pa teh podatkov ne vsebujejo, programi za vizualizacijo sami sklepajo o povezanosti atomov. Večina programov omogoča različno vizualizacijo molekul, npr. model paličic, model kroglic in paličic ter prostorsko zapolnjen model.

Zaradi velikosti bioloških makromolekul (predvsem proteinov), bi bila njihova vizualizacija z omenjenimi modeli preveč nepregledna, zato shematsko predstavljamo njihove ključne elemente strukture – glavna veriga proteina in sekundarne strukture (alfa vijačnica, beta strukture) oz. ponazorimo površino molekule.

1.5.2 Molekulska mehanika (MM)

Molekulska mehanika uporablja klasično (Newtonovo) mehaniko za napoved potencialne energije molekule v odvisnosti od njene konformacije. Metodam molekulske mehanike je skupno, da atom obravnavajo kot en delec. Vsakemu delcu predpišemo van der Waalsove parametre in atomski naboj. Kovalentne vezi so ponazorjene z vzmetmi, ki imajo določeno dolžino v ravnovesnem stanju. Vrednosti parametrov so pridobljene eksperimentalno ali s kvantnomehanskimi računi.

Potencialna energija molekule oz. sistema je vsota potencialnih energij kovalentnih vezi in nekovalentnih interakcij. K potencialni energiji kovalentnih vezi prispevajo deformacija kovalentne vezi (v skladu s Hookovim zakonom), deformacija valenčnega kota in potencial torzijskega kota. Potencialna energija nekovalentnih interakcij je sestavljena iz energij zaradi van der Waalsovih in elektrostatskih interakcij.



Slika 8: Ponazoritev vplivov na potencialno energijo molekul (prirejeno po 15)

1.5.3 Molekulska dinamika (MD)

Molekulska dinamika je metoda simulacije gibanja atomov in molekul. Zaradi velikega števila delcev, proučevanih sistemov ne moremo vrednotiti analitično, ampak z molekulske dinamiko uporabljamo numerične metode. Trajektorije posameznih delcev se izračunajo na podlagi numeričnega reševanja Newtonovih enačb gibanja, za sistem v katerem delci interagirajo na podlagi polja sil. To je mehanistični pristop za napoved geometrije z upoštevanjem vseh sil med posameznimi atomi. Podatke za polje sil dobimo iz *ab initio* računov ali iz eksperimentalnih podatkov. Rezultat MD je močno odvisen od izbora polja sil, npr. GROMOS, AMBER, CHARMM, itd. Vsa moderna polja sil za biološke makromolekule imajo za osnovo Warshel-Lifsonove parametre (16).

1.5.4 Kvantnomehanski pristopi (QM)

Ker z molekulske mehaniko ne moremo zadovoljivo opisati določenih pojavov (npr. tvorba in cepitev kovalentne vezi), moramo v tem primeru uporabiti fizikalni opis atomov in molekul. Kvantna mehanika opisuje molekule v smislu interakcij med atomskimi jedri ter

elektroni, molekulska geometrijo pa v smislu najnižje energije razporeditve jeder. Vse te metode temeljijo na reševanju Schrödingerjeve enačbe za elektrone (16). Govorimo o *ab initio* (lat. iz prvih principov) računih, pri katerih v začetku nimamo na voljo eksperimentalnih podatkov, ampak le nabor elektronov in jeder v molekuli. Čas takšnih računov se večanjem števila delcev eksponentno povečuje, zato so ti računi smiselni le v sistemih z največ približno 100 atomi.

Ker je Schrödingerjeva enačba za sistem z več elektroni analitično nerešljiva, so potrebne določene aproksimacije, da lahko jo lahko uporabimo na biološko zanimivih sistemih. Takšni poenostavitvi sta, da rešujemo časovno neodvisno Schrödingerjevo enačbo in Born-Oppenheimerjev približek, ki je predpostavka, da se jedra ne gibljejo (v resnici se gibljejo, ampak bistveno počasneje od elektronov). Za kvantnomehanske račune sta bistvena dva parametra: aproksimativna metoda in bazni set (17).

Aproksimativnih metod za reševanje Schrödingerjeve enačbe je več. Omembe vredna je Hartree-Fock (HF) metoda, ki predpostavlja, da se elektroni gibljejo po orbitalah neodvisno. Ta metoda je izhodišče za mnoge druge metode – tako enostavnejše, kot kompleksnejše. Še en primer aproksimativne metode je teorija gostotnih funkcionalov (DFT, ang. *Density functional theory*), katere osnova je analiza elektronske gostote (17).

Bazni set je niz matematičnih funkcij, ki opisujejo valovno funkcijo molekule. Bazni set je sestavljen iz atomskih orbital ali iz ravninskega valovanja. Molekulske orbitale so linearna kombinacija atomskih orbital, Slaterjevega ali Gaussovega tipa. Gaussove orbitale so za računanje bolj ugodne (17).

1.5.5 Hibridni večnivojski pristopi (QM/MM)

Zaradi velikosti sistemov z biološkimi makromolekulami, je simulacija izključno s kvantnomehanskimi pristopi zaenkrat neizvedljiva, po drugi strani pa je za reakcije, pri katerih pride do nastanek oz. cepitev vezi, nujna uporaba kvantnomehanskih pristopov. Rešitev tega problema predstavljajo hibridni pristopi (QM/MM), ki združujejo hitrost molekulske mehanike in natančnost kvantne mehanike. V ta namen makromolekulo razdelimo na dva dela – manjšo regijo (aktivno oz. vezavno mesto) obravnavamo s kvantnomehanskim opisom, preostali del sistema pa s poljubno empirično potencialno funkcijo. Za večnivojsko metodologijo QM/MM je leta 2013 podeljena Nobelova nagrada za kemijo. (16).

2 Namen dela in delovne hipoteze

Z modeliranjem majhnih in preprostih sistemov z vodikovimi vezmi lahko proučujemo samo naravo vodikove vezi ter njeno kompleksnost, kar je bistveno za razumevanje vodikove vezi v večjih polarnih sistemih (kot so na primer proteini), ki nenehno fluktuirajo.

Vodikova vez je izredno pomembna pri vezavi liganda na receptor oz. katerokoli drugo biološko makromolekulo. Z devteriranjem se izmenljivi vodikovi atomi zamenjajo z devterijevimi, ki pa so dvakrat težji zaradi dodatnega nevtrona v jedru. Pri enostavni inkubaciji v devterijevem oksidu, D_2O , se tako atomi vodika na elektronegativnih elementih zamenjajo za atome devterija, kar pomeni spremembo v interakciji ligand-receptor. Devteriranje spremeni lastnosti vode in biološko makromolekulo (sprememba v stabilnosti). Rezultate metod računske kemije bomo primerjali z eksperimentalnimi podatki, ki so bili pridobljeni na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo v Ljubljani. Prav tako bomo primerjali ali dobljeni rezultati za metilirane derivate histamina boljše korelirajo z eksperimentalnimi rezultati, ki so bili pridobljeni na modelnem sistemu izoliranih astrocitov novorojenih podgan ali na modelnem sistemu izoliranih membran astrocitov novorojenih podgan.

V magistrskem delu bomo preverili naslednje hipoteze:

- Prosta energija hidratacije liganda je manj ugodna v devterijevem oksidu kot v vodi, saj pride do skrajšanja N-H in O-H vezi ter posledično do podaljšanja vodikove vezi.
- Prosta energija interakcije med ligandom in vezavnim mestom histaminskega H_2 receptorja je v devteriranem sistemu manj ugodna, kot v nedepteriranem sistemu, saj pride do skrajšanja N-H in O-H vezi ter posledično do podaljšanja vodikove vezi.
- Prosta vezavna energija, ki se kaže kot afiniteta, bo po devteriranju drugačna, saj je razlika proste energije interakcije liganda z receptorjem in proste energije hidratacije liganda. Odvisno katera prosta energija prevlada, se lahko afiniteta zmanjša oz. poveča.

3 Metode in oprema

Kvantno kemijski izračuni večjih sistemov so zelo zahtevni, zato zahtevajo visokozmogljive večprocesorske računalnike, konkretnije, za račune smo uporabili gručo računalnikov na Kemijskem inštitutu. Ker gruča računalnikov ne podpira grafičnega uporabniškega vmesnika, smo izdelavo tridimenzionalnih struktur in kasneje vizualizacijo rezultatov izvedli na lokalnem računalniku.

3.1 Strojna oprema

Preglednica III: Uporabljen lokalni računalnik, MacBook Pro

<i>Oprema</i>	<i>Specifikacije</i>
<i>Procesor</i>	2 core Intel Core i5 @ 2,5 GHz
<i>Delovni pomnilnik (RAM)</i>	8 GB
<i>Grafična kartica</i>	Intel HD Graphics 4000 1536 MB
<i>Operacijski sistem</i>	macOS Sierra 10.12.5
<i>Trdi disk</i>	240 GB SSD Transcend

Preglednica IV: Uporabljena gruča računalnikov

<i>Oprema</i>	<i>Specifikacije</i>
<i>Procesor</i>	20 core Intel Xeon E5-2660v3 @ 2.60 GHz
<i>Delovni pomnilnik (RAM)</i>	64 GB
<i>Trdi disk</i>	1 TB HDD Toshiba

3.2 Programska oprema

Preglednica V: Uporabljena programska oprema

<i>Program</i>	<i>Verzija</i>	<i>Namen</i>
<i>Molden</i>	5.7	Konstrukcija 3D strukture
<i>Gaussian</i>	g09	Kvantno kemijski računi
<i>Chimera</i>	1.11.2	Vizualizacija struktur
<i>Gromacs</i>	5.0.2	Molekulska dinamika
<i>VMD</i>	1.9.3	Vizualizacija trajektorije molekulske dinamike

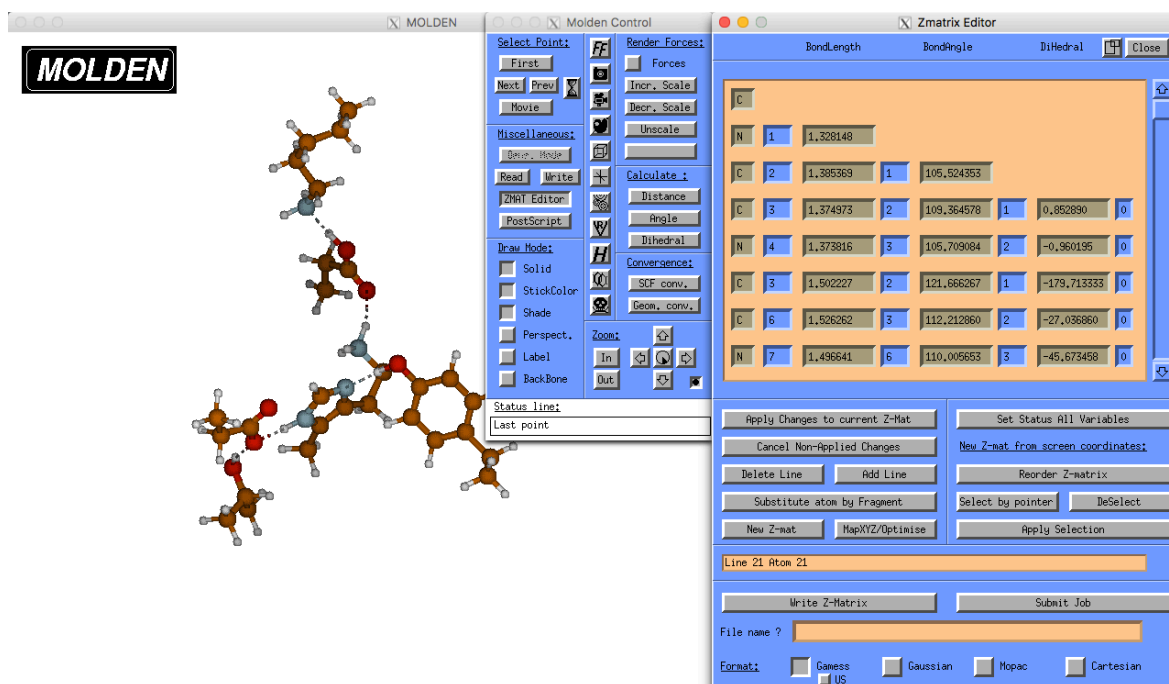
4 Postopek dela

Tridimenzionalne strukture, ki smo ji potrebovali za račune, smo konstruirali s programom za vizualizacijo elektronske in molekulske strukture Molden (Slika 10). S programom Molden lahko strukturo izpišemo na več načinov. Kljub temu, da je za nadaljnje račune s programom Gaussian09 bolj ugoden zapis v Z-matriki, smo se odločili za kartezične koordinate, saj je v tem formatu enostavneje fiksirati atome in medatomske razdalje, ki so ključne za naše račune.

Izvoženo datoteko s koordinatami, pridobljeno s programom Molden, smo z enostavnim urejevalnikom besedila opremili tako, da je ustrezala zahtevam programa Gaussian09 (Slika 9). Na začetku vhodne datoteke specificiramo količino systemskega pomnilnika, ki ga ima program na voljo, število procesorskih jeder, uporabljenih za račun, in lokacijo shranjevanje začasnih podatkov (angl. *checkpoint file*), kar je posebej uporabno pri daljših računih, saj ta datoteka omogoča zagon računa iz določene točke računa ob nekonvergenci računa. Nato sledi ukazna vrstica, ki kot prvo vsebuje nivo teorije in bazni set, v našem primeru *M06-2X/6-31+G(d,p)*. Sledi ukaz *Opt* za geometrijsko optimizacijo z raznim opcijami – z *MaxCycles=N* določimo število korakov optimizacije, pri čemer je privzeto število 20, kar za večje račune ne zadošča, z *modredundant* pa ukažemo, da program prebere geometrijske omejitve na koncu datoteke (npr. z *X 1 F* zamrznemo (fiksiramo) koordinato atoma 1, z *B 1 2 F* pa razdaljo med atomoma 1 in 2, možna je tudi fiksacija kota in torzijskega kota). Ukaz *SCRF* aktivira model reakcijskega polja topila, z opcijo *Read* pa lahko določimo poljubno dielektrično konstanto topila, ki jo na koncu vhodne datoteke definiramo z vrstico *eps=N*. Nato sledi neobvezen komentar. Po tem podamo še naboj celotnega sistema in multipliciteto. Temu sledijo koordinate ter morebitne geometrijske omejitve in dielektrična konstanta. Datoteko, pripravljeno za računanje, smo s pomočjo skripta predložili programu Gaussian 09, ki je nato na gruči računalnikov izvedel račune. Gaussian 09 je program za računsko kemijo, ki omogoča kvantnomehanske račune (*ab initio* računi). Uporabili smo ga za geometrijsko optimizacijo, ima pa še druge funkcije kot npr. napoved vibracijskega spektra in kemijskih premikov (NMR).

<code>%mem=12GB</code>	Količina sistemkega pomnilnika
<code>%nproc=16</code>	Število procesorskih jeder
<code>%chk=methish2d</code>	Datoteka začasne podatke
<code># M062X/6-31+G(d,p)</code>	Nivo teorije in bazni set
<code># Opt=(MaxCycles=500,modredundant)</code>	Ukaz za optimizacijo z opcijami
<code># SCRF=(CPCM,Read)</code>	Ukaz za reakcijsko polje
2-metil histamin v h2 receptorju, devterij	Komentar
O 1	Naboj in multipliciteta
C -2.326275 -0.818028 -1.072575	}
N -1.852256 0.260280 -0.454130	
C -2.263133 0.160828 0.863819	
C -2.968677 -1.002485 1.023246	
N -3.009820 -1.595370 -0.213583	
C -1.852437 1.171474 1.891577	
...	
H 10.952167 1.574903 -3.246560	}
H 10.098509 0.238015 -4.030493	
H 11.610337 -0.066442 -3.164589	
H -1.489094 -0.406368 -2.977733	
H -3.088063 -1.177744 -3.039716	
H -1.668957 -2.143668 -2.601603	
...	
X 18 F	}
X 22 F	
X 27 F	
X 34 F	
X 37 F	}
B 28 61 F	
B 29 62 F	
B 29 60 F	}
<code>eps=4</code>	Določena dielektrična konstanta

Slika 9: Primer vhodne datoteke za Gaussian 09 in opis posameznih komponent datoteke



Slika 10: Uporabniški vmesnik programa MolDen

4.1 Izračun proste energije hidratacije

Priprava vhodnih datotek

V programu MolDen smo oblikovali tridimenzionalne strukture liganda v plinski fazi, liganda v interakciji z molekulami vode, molekule vode, dimera dveh molekul vode in petih molekul vode povezanih v pentamer. Za račune v vodni raztopini smo uporabili reakcijsko polje topil CPCM z v programu privzeto dielektrično konstanto za vodo ($\epsilon=78,3553$).

Dobljene koordinate smo opremili s potrebnimi ukazi in opcijami, da so bile uporabne za geometrijsko optimizacijo.

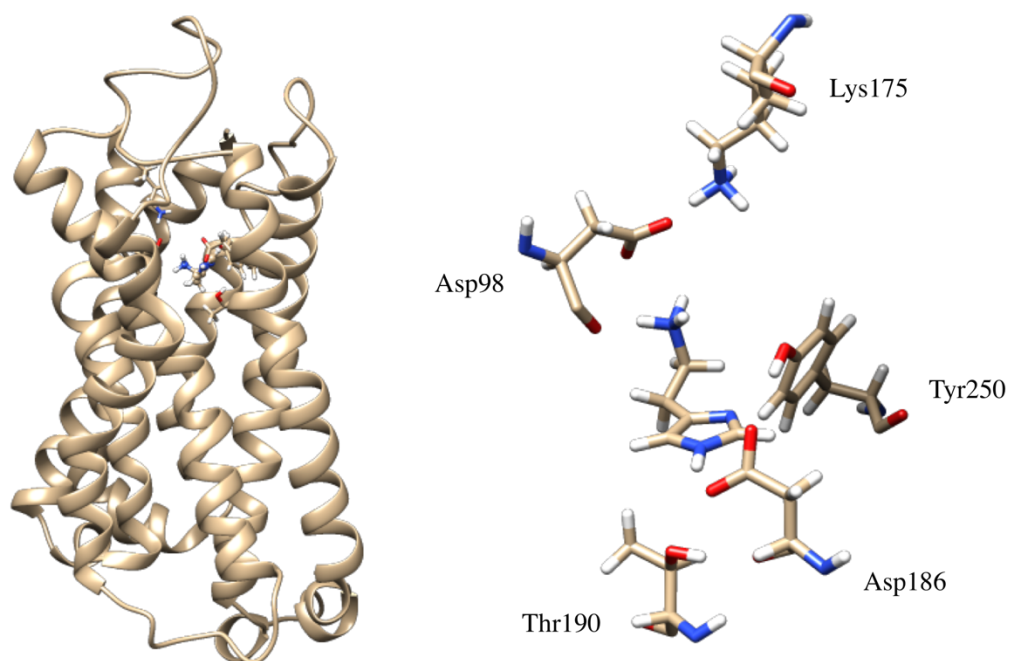
Geometrijska optimizacija

Program Gaussian 09 smo zagnali s pripravljenimi datotekami in tako za vsako komponento sheme izvedli popolno geometrijsko optimizacijo. Uporabili smo nivo teorije M06-2X z baznim setom 6-31+G(d,p). Uporabljeni bazni set je dokaj fleksibilen. Pri izračunih smo tako uporabili 6 Gaussovih baznih funkcij za opis notranjih orbital elementov, 1 oz. 3 bazne funkcije za opis zunanjih elementov, na težke elemente (C, N, O, S) pa so bile dodane polarizacijske funkcije.

Spremenjena geometrija pri devteriranju je posledica kvantne narave gibanja jeder. Pri našem pristopu smo upoštevali eksperimentalne podatke devterijskih zvrsti. Z nevtronsko difrakcijsko analizo kristalov alanina, ki so jo izvedli Bordallo in sodelavci (12), so ugotovili, da je dolžina vezi N-D za 2,3% manjša od dolžine vezi N-H. Tako smo geometrijsko optimizirani strukturi iz prejšnje točke skrajšali dolžine vezi O-H in N-H za 2,3% ter novo dolžino vezi držali fiksno pri optimizaciji. Predpostavili smo, da je skrajšanje N-H in O-H vezi po devteriranju naših ligandov enako kot v kristalu alanina, kar temelji na primerljivih učinkih kristalnega polja ter vodne raztopine. Dobljene datoteke smo enako kot prej opremili z ukazi in opcijami in zagnali optimizacijo na nivojo teorije in z baznim setom M06-2X/6-31+G(d,p).

4.2 Izračun proste energije interakcije ligand-receptor

Glede na dejstvo, da je sistem liganda vezanega na histaminski receptorj H_2 prevelik za kvantno-kemijsko obravnavo, smo prvo morali določiti aminokislinske ostanke, ki so bistveni za vezavo. Ker terciarna struktura H_2 receptorja še ni eksperimentalno določena, smo uporabili homologni model receptorja, ki so ga zgradili Kržan s sodelavci (18). Model temelji na humanem histaminskem H_1 receptorju, humanih adrenergičnem receptorjih β_1 in β_2 , neurokininskem-1 receptorju ter muskarinskem receptorju M3. S pomočjo molekulske dinamike so ugotovili, da so za vezavo pomembni aminokislinski ostanki aspartat na mestu 98 (Asp⁹⁸), aspartat na mestu 186 (Asp¹⁸⁶) in tirozin na mestu 250 (Tyr²⁵⁰). Prejšnji homologni modeli histaminskega receptorja H_2 nakazujejo, da je za vezavo namesto Tyr²⁵⁰ pomembnejši treonin na mestu 190 (Thr¹⁹⁰) (19), v našem uporabljenem modelu pa Thr¹⁹⁰ ni na poziciji, da bi omogočal vezavo. V neposredni bližini vezavnega mesta se nahaja tudi lizin (Lys¹⁷⁵), ki bi lahko bil pomemben za vezavo. Tako smo za naše račune uporabili poleg bistvenih aminokislinskih ostankov Asp⁹⁸, Asp¹⁸⁶ in Tyr²⁵⁰ še Thr¹⁹⁰ ter Lys¹⁷⁵ za obogatitev našega modela.



Slika 11: Struktura histaminskega H₂ receptorja z vezanim histaminom. Asp⁹⁸ tvori vez z etilaminsko skupino, Asp¹⁸⁶ z NH imidazolnega obroča, Tyr²⁵⁰ pa z imino dušikom imidazolnega obroča.

Priprava vhodnih datotek

Iz pdb datoteke najbolj verjetne strukture histaminskega receptorja H₂, dobljene iz simulacije molekulske dinamike (18) smo izrezali naših 5 aminokislinskih ostankov – Asp98, Lys175, Asp186, Thr190 in Tyr250. Aminokislinske ostanke smo prirezali pri α -C atomih in koordinate α -C atomov zamrznili. Za izračun smo uporabili protonacijska stanja -1 za oba aspartata (-COO⁻) in +1 za lizin (-NH₃⁺) glede na rezultate analize s PROPKA, ki napove vrednosti pKa in protonacijska stanja posameznih aminokislinskih ostankov. Najbolj stabilna oblika histamina je protonirani (-NH₃⁺), ³H-imidazolni tautomer, zato smo za izračune s 2- in 4-metil histaminom uporabili enake tautomerne oblike teh dveh ligandov. Za račune s cimetidinom in famotidinom smo uporabili nenabiti molekuli, zaradi eksperimentalnih podatkov pKa cimetidina, ki je med 6,80 in 6,93 (20) ter pKa famotidina, ki je med 6,76 in 6,89 (21). Glede na to, da gre pri 2- in 4-metil histaminu za histaminu strukturno zelo podobna agonista in ker sta cimetidin in famotidin kompetitivna antagonist, smo lahko za račune uporabili prej omenjeno vezavno mesto za sam histamin.

Geometrijska optimizacija

Datoteke s koordinatami vezavnega mesta in vezavnega mesta smo pripravili za računanje z Gaussian 09. Ker Gaussian 09 lahko optimalno geometrijo najde v lokalnem minimumu glede na začetno konformacijo v vhodni datoteki, je bilo potrebno preizkušati več začetnih geometrij. Za notranje okolje proteina smo predpostavili dielektrično konstanto $\epsilon=4,0$ kot je predlagal Himo s sodelavci (22). Geometrijsko optimizacijo smo izvedli na nivoju teorije in z baznim setom M06-2X/6-31+G(d,p).

Podobno kot pri izračunih proste energije hidratacije, smo po optimizaciji sistema z vodikom izhodne datoteke obdelali tako, da smo O-H in N-H vezi skrajšali za 2,3%, dolžine zamrznili in ponovno izvedli geometrijsko optimizacijo na nivoju teorije in z baznim setom M06-2X/6-31+G(d,p).

4.3 Sprememba proste vezavne energije po devteriranju

Spremembo proste vezavne energije liganda na histaminski receptor H_2 po devteriranju smo izračunali po naslednji enačbi:

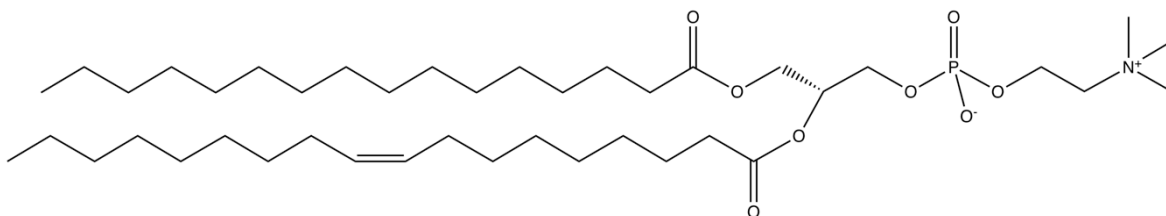
$$\Delta\Delta G_{H \rightarrow D}^{Vezavna} = \Delta\Delta G_{H \rightarrow D}^{Interakcijska} - \Delta\Delta G_{H \rightarrow D}^{Hidratacijska}$$

Enačba 4: Sprememba proste vezavne energije po devteriranju

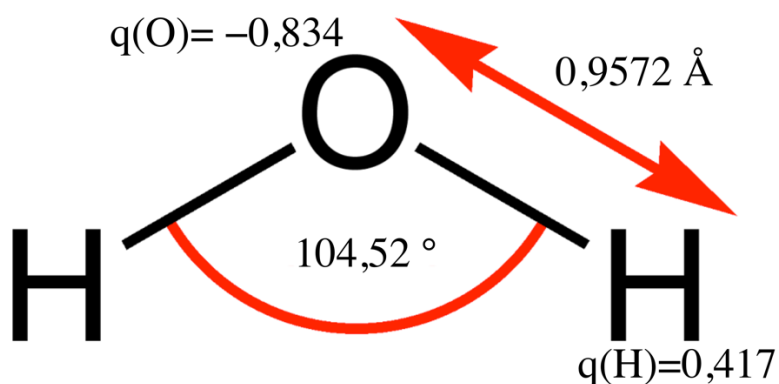
Prosta energija vezave je reverzibilno delo za prenos liganda iz vodne raztopine v vezavno mesto receptorja. Ker so v okolici liganda prisotne molekule vode, je potrebna energija, da se molekule vode odstranijo in se ligand premakne iz vodne faze v notranjost receptorja, moramo od proste energije interakcije odšteti prosto energijo hidratacije liganda.

4.4 Molekulska dinamika

Za molekulsko dinamiko smo uporabili programski paket Gromacs 5.0.2, s katerim smo izvedli pripravo sistema ter molekulsko dinamiko. S spletnim orodjem *CHARMM-GUI* smo pdb datoteki histaminskega H₂ receptorja dodali lipidni dvosloj iz palmitoil oleoil fosfatidilholina (POPC). Iz dobljene nove pdb datoteke histaminskega H₂ receptorja v lipidnem dvosloju smo pripravili topologijo. Uporabili smo polje sil *CHARMM 36*, ki vsebuje parametre za proteine in za razliko od starejših verzij *CHARMM*, tudi podatke za lipide. Ker polja sil za molekulsko dinamiko ne vsebujejo parametrov za majhne organske molekule, smo uporabili spletno orodje *SwissParam*, ki iz zapisa željene molekule v mol2 formatu zapiše topologijo. Dobljeno topologijo histamina smo dodali topologiji H₂ receptorja v lipidnem dvosloju. Sistem smo postavili v simulacijsko škatlo dimenzij 92 x 92 x 120 Å, kateri smo dodali molekule vode in sicer smo uporabili eksplicitni model TIP3P. V tej točki je skupen naboj sistema znašal +12, zato smo 12 molekul vode zamenjali s kloridnimi ioni, da smo zagotovili elektronevtralnost sistema. Nato smo izvedli energijsko minimizacijo in uravnoteženje sistema pri konstantni temperaturi (300 K) ter tlaku (1 bar). Po uravnoteženju smo zagnali produkcijsko fazo dinamike, ki je trajala 40 ns.



Slika 12: POPC – palmitoil oleoil fosfatidilholin



Slika 13: TIP3P model vode. V sliki so navedeni delni naboji, OH razdalja in HOH kot.

5 Rezultati in razprava

Receptorji, sklopljeni s proteinom G predstavljajo največjo družino, v katero spada približno 800 membranskih proteinov. Ti receptorji bi naj predstavljali med 30 in 50% tarč vseh učinkovin na trgu. Ker so v telesu zelo razširjeni, so vpleteni tudi v veliko število patologij. Leta 2012 sta Nobelovo nagrado za kemijo dobila Robert J. Lefkowitz in Brian K. Kobilka za določitev kristalne strukture in delovanja GPCR (adrenergični receptor β_2) (24).

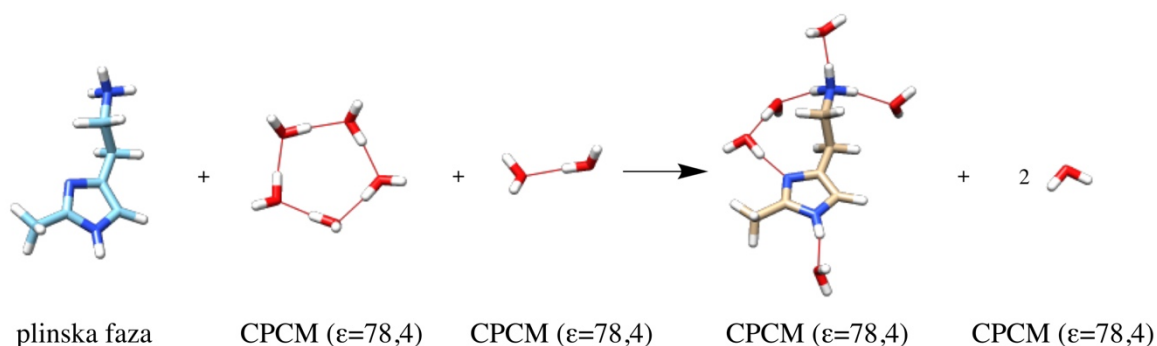
Bistvo GPCR je, da prepoznajo ligand izven celice, tudi v minimalnih koncentracijah, in preko spremembe svoje konformacije po vezavi tega liganda aktivirajo kaskado signalnih poti v celici ter tako fiziološki odziv. Ključni posredniki v tem procesu so sekundarni prenašalci. Aktivacija GPCR je kompleksen proces, ki vključuje spremembe konformacije, zato je za proučevanje mehanizma aktivacije ključno, da poznamo terciarno strukturo proteina, za kar pa je potrebno protein izolirati, kristalizirati in analizirati z rentgensko difrakcijo. Največji problem predstavlja kristalizacija GPCR in membranskih proteinov nasploh. Dodaten izziv je poznavanje aktivne in neaktivne oblike receptorja, katerih relativne stabilnosti sta ključ za ločevanje med agonisti in antagonisti. Molekulske simulacije danes še ne morejo napovedati razliko med agonisti in antagonisti.

V nalogi smo se osredotočili na receptor, sklopljen s proteinom G, natančneje histaminski H_2 receptor. Z metodami računske kemije smo proučili pomembnost vodikove vezi pri vezavi liganda na receptor in interakciji liganda z vodo. Prav tako je potrebno upoštevati notranje okolje proteina za katerega smo na podlagi predloga Himo s sodelavci (22) izbrali vrednost dielektrične konstante $\epsilon=4$.

Po inkubaciji v D_2O se atomi vodika na elektronegativnih elementih zamenjajo za atome devterija, kar vodi v spremembo medmolekulskega potenciala. To bi lahko pomenilo tudi spremembo v entropijskem prispevku k prosti energiji vezave, ampak je perturbacija majhna, zato bo sprememba zanemarljiva.

5.1 Prosta energija hidratacije 2- in 4-metil histamina

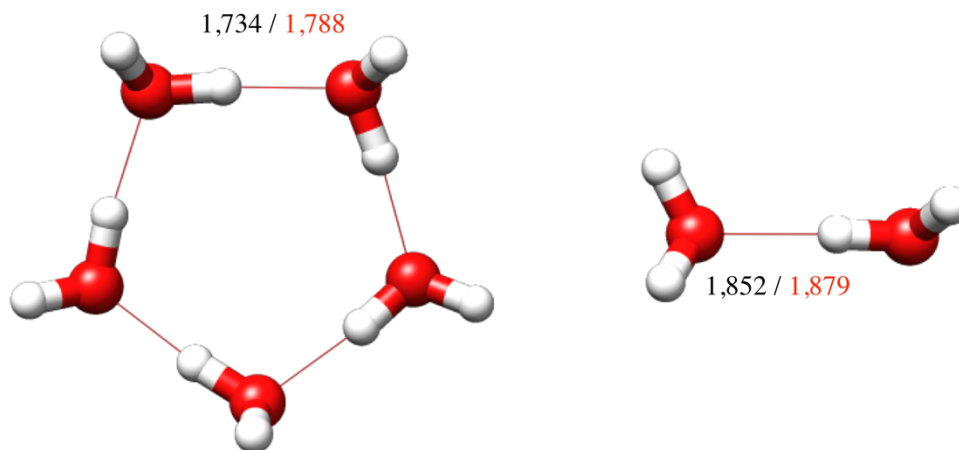
Za izračun proste energije hidratacije metiliranih analogov histamina, smo uporabili model, ki sta ga predlagala Vianello in Mavri (23). Na levi strani sheme je histamin v plinski fazi, dve molekuli vode povezani z vodikovo vezjo v dimer in pet molekul vode povezanih z vodikovimi vezmi v pentamer. Na desni strani sheme pa je histamin v interakciji s petimi molekulami vode in dve prosti molekuli vode. Bistvo te kompleksne reakcijske sheme je, da je na obeh straneh enako število vodikovih vezi. Shema je bila narejena za histamin, ampak zaradi strukturne podobnosti 2- in 4-metil histamina ter uspešnosti sheme za histamin, smo uporabili enak model (Slika 14).



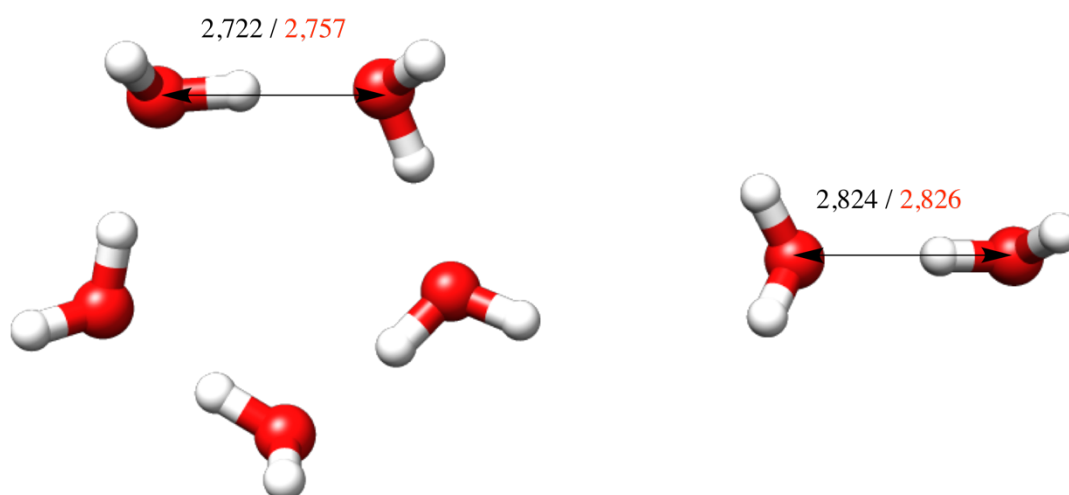
Slika 14: Uporabljena shema za izračun proste energije hidratacije monokationa 2-metil histamina. V oklepajih je navedena izbira dielektrične konstante. Enaka shema je bila uporabljena za izračun proste energije hidratacije 4-metil histamina.

Po prvotni geometrijski optimizaciji smo dolžine N-H in O-H vezi skrajšali za 2,3%, novo dolžino vezi smo zamrznili in ponovno pognali geometrijsko optimizacijo z Gaussian 09. Tako se dolžina teh vezi med optimizacijo ni več spreminjala.

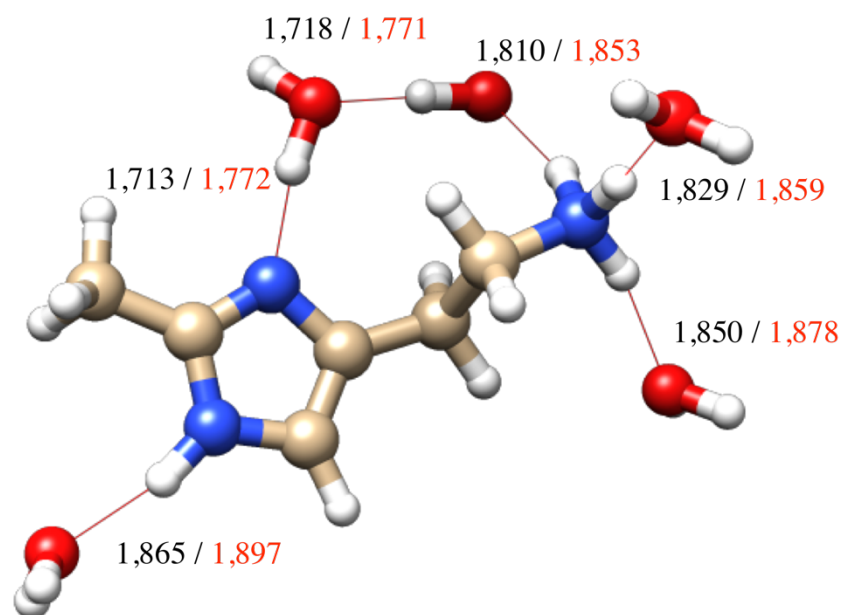
Zaradi Ubbelohdejevega efekta je prišlo do zmanjšanjem razdalje med donorjem vodika (N oz. O) in samim vodikom, kar je sicer stabiliziralo kovalentno vez med omenjenima atomoma, vodikova vez pa se je podaljšala in posledično se je zmanjšala tudi energija vodikove vezi. Povečala se je tudi razdalja med donorjem vodika (N oz. O) in akceptorjem vodikove vezi (N oz. O).



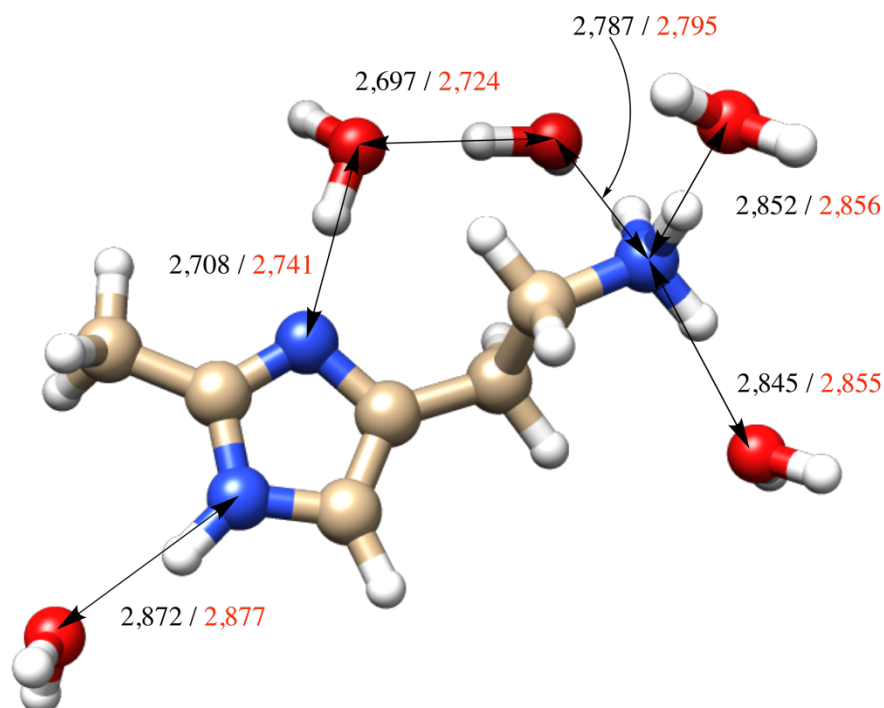
Slika 15: Dolžina vodikovih vezi v pentameru in dimeru vode pred in po devteriranju. S črno barvo so označene dolžine pred devteriranjem, z rdečo pa po devteriranju. Vse vrednosti so v Å.



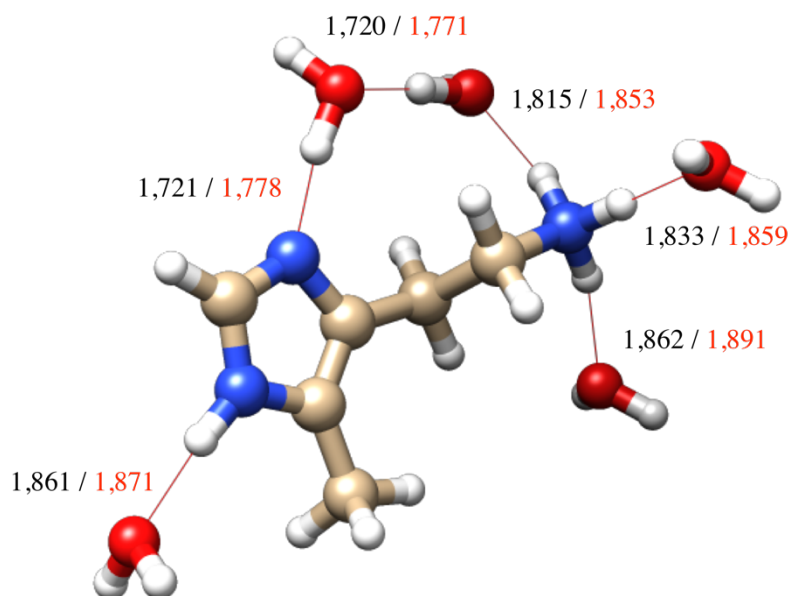
Slika 16: Razdalja med donorjem in akceptorjem vodikovega atoma v pentameru in dimeru vode pred in po devteriranju. S črno barvo so označene dolžine pred devteriranjem, z rdečo pa po devteriranju. Vse vrednosti so v Å.



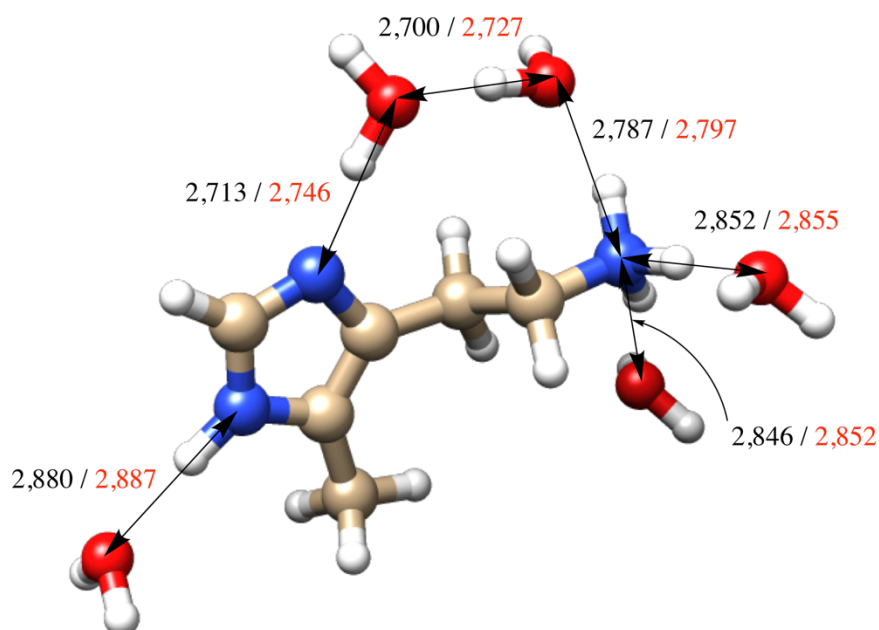
Slika 17: Dolžina vodikovih vezi v sistemu hidratiranega 2-metil histamina pred in po devteriranju. S črno barvo so označene dolžine pred devteriranju, z rdečo pa po devteriranju. Vse vrednosti so v Å.



Slika 18: Razdalja med donorjem in akceptorjem vodika v sistemu hidratiranega 2-metil histamina pred in po devteriranju. S črno barvo so označene dolžine pred devteriranju, z rdečo pa po devteriranju. Vse vrednosti so v Å.



Slika 19: Dolžina vodikovih vezi v sistemu hidratiranega 4-metil histamina pred in po devteriranju. S črno barvo so označene dolžine pred devteriranju, z rdečo pa po devteriranju. Vse vrednosti so v Å.



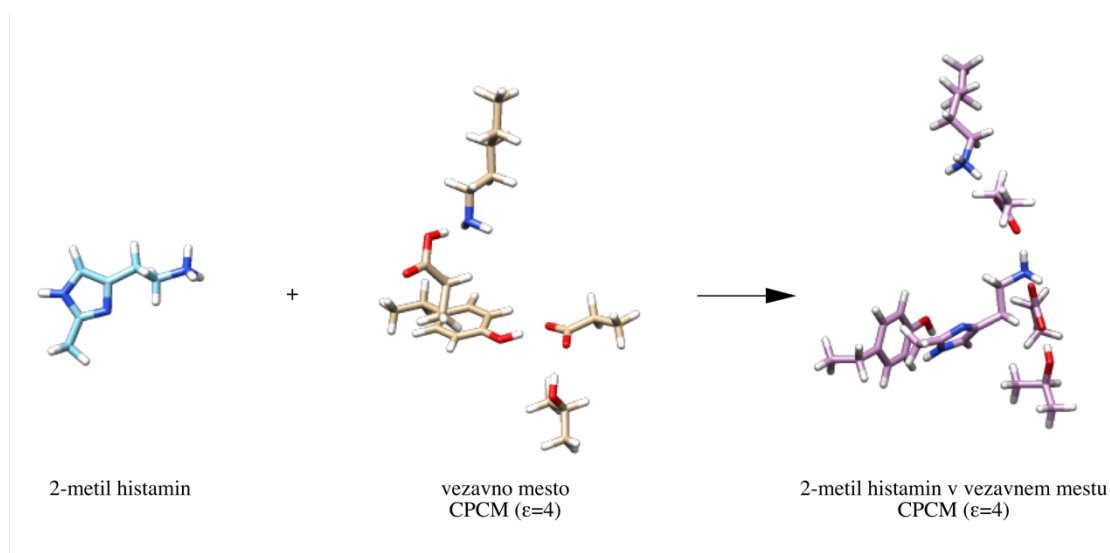
Slika 20: Razdalja med donorjem in akceptorjem vodikovega atoma v sistemu hidratiranega 4-metil histamina pred in po devteriranju. S črno barvo so označene dolžine pred devteriranju, z rdečo pa po devteriranju. Vse vrednosti so v Å.

Izračunana vrednost proste energije hidratacije 2-metil histamina je bila -66,92 kcal/mol, po devteriranju pa se je povečala za 0,04 kcal/mol, se pravi da je znašala -66,88 kcal/mol. V primeru 4-metil histamina se je prosta energija hidratacije po devteriranju zmanjšala za 0,17 kcal/mol. Tako je znašala -67,38 kcal/mol pred devteriranju in -67,55 kcal/mol po devteriranju.

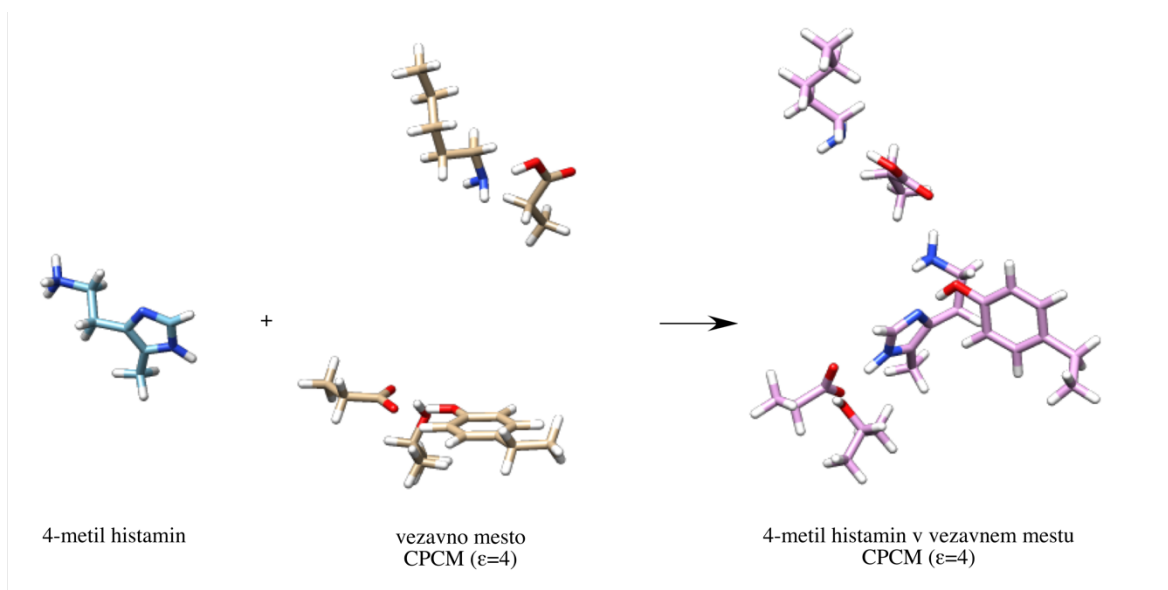
Iz rezultatov je razvidno, da je za 2-metil histamin solvatacija bolj ugodna v vodi, za 4-metil histamin pa v devterijevem oksidu.

5.2 Prosta energija interakcije 2- in 4-metil histamina z receptorjem

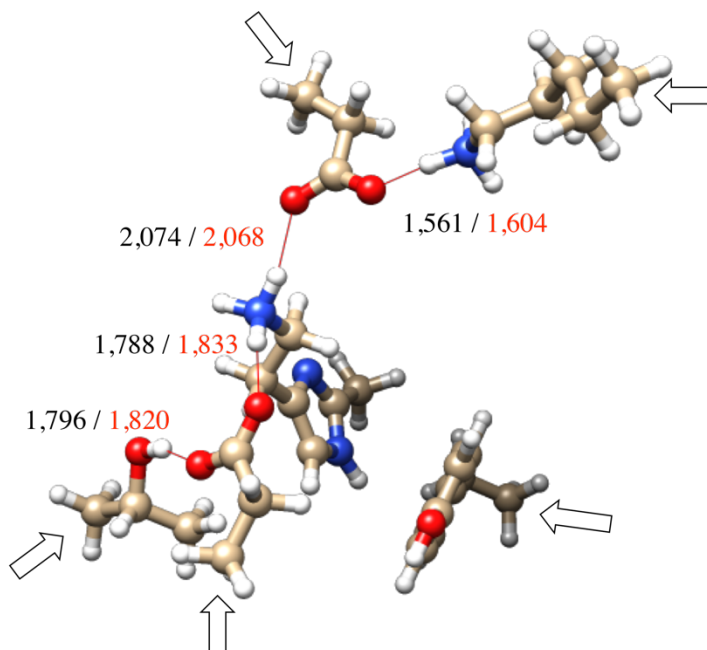
Prosto energijo interakcije smo izračunali po shemah prikazanih na slikah 21 in 22. V primeru 4-metil histamina je interakcija enaka kot pri samem histaminu (Slika 11) – etilaminska skupina interagira z Asp⁹⁸, NH imidazolnega obroča z Asp¹⁸⁶, imino dušikov atom imidazolnega obroča pa s Tyr²⁵⁰. Tak način vezavi ni dal rezultatov, ki bi bili v skladu z eksperimentalnimi podatki, zato smo morali izbrati drugo začetno konfiguracijo 2-metil histamina v vezavnem mestu. Sprejemljive rezultate smo dobili s shemo prikazano na sliki 21. Etilaminska skupina 2-metil histamina reagira z Asp⁹⁸ in Asp¹⁸⁶, imidazolni obroč pa s Tyr²⁵⁰, verjetno kot posledica π -interakcij med aromatskima obročema. Naš model napoveduje prenos protona z Asp⁹⁸ na Lys¹⁷⁵ v primeru 2-metil histamina.



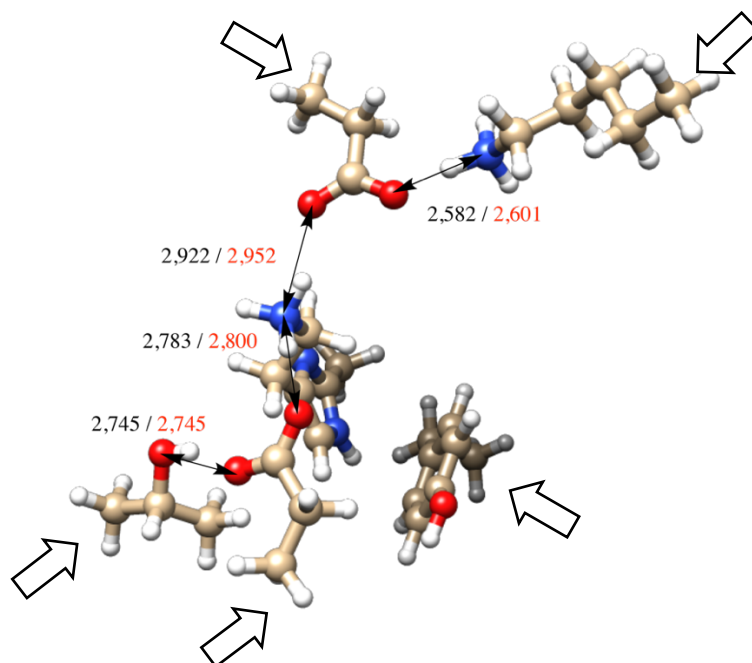
Slika 21: Shema za izračun interakcije med 2-metil histaminom in aminokislinskimi ostanki vezavnega mesta receptorja. Vse strukture so bile optimizirane na nivoju teorije M06-2X/6-31+G(d,p) z reakcijskim poljem topila CPCM. Izbira dielektrične konstante je navedena v oklepaju.



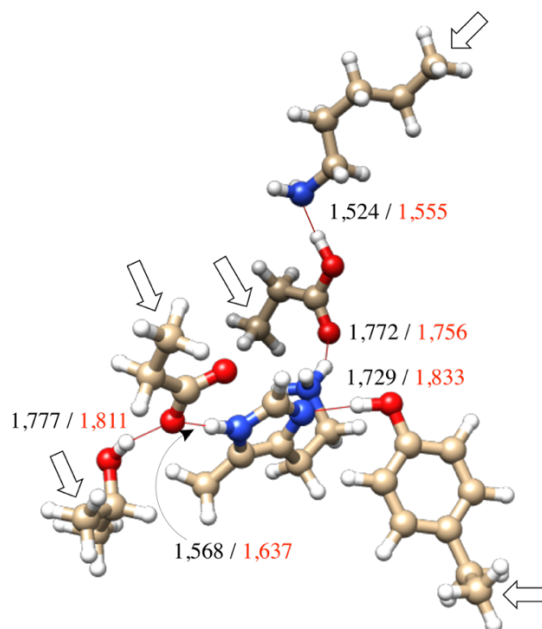
Slika 22: Shema za izračun interakcije med 4-metil histaminom in aminokislinskimi ostanki vezavnega mesta receptorja. Vse strukture so bile optimizirane na nivoju teorije M06-2X/6-31+G(d,p) z reakcijskim poljem topila CPCM. Izbira dielektrične konstante je navedena v oklepaju.



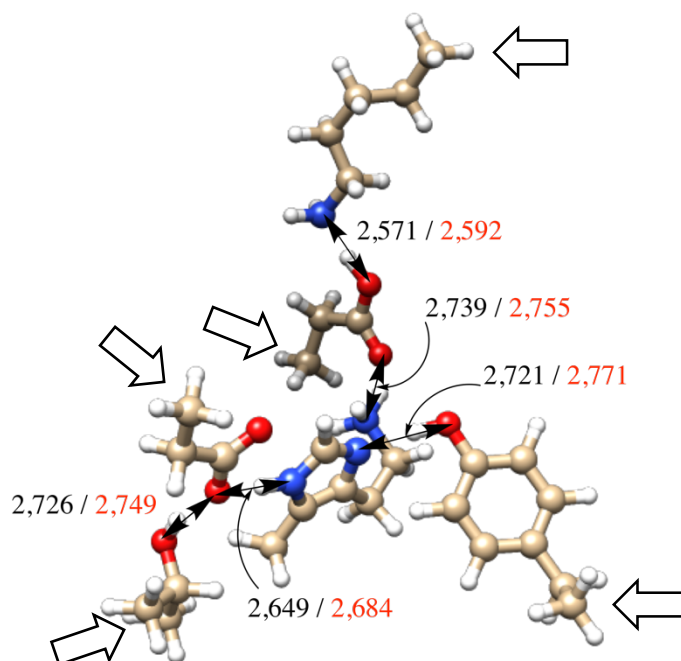
Slika 23: Dolžina vodikovih vezi v sistemu 2-metil histamina v vezavnem mestu receptorja pred in po devteriranju. S črno barvo so označene dolžine pred devteriranjem, z rdečo pa po devteriranju. Vse vrednosti so v Å. C_{α} atomi aminokislinskih ostankov, ki so med optimizaciji bili zamrznjeni, so označeni z belimi puščicami.



Slika 24: Razdalja med donorjem in akceptorjem vodika v sistemu 2-metil histamina v vezavnem mestu receptorja pred in po devteriranju. S črno barvo so označene dolžine pred devteriranjem, z rdečo pa po devteriranju. Vse vrednosti so v Å. C_{α} atomi aminokislinskih ostankov, ki so bili med optimizacijo zamrznjeni, so označeni z belimi puščicami.



Slika 25: Dolžina vodikovih vezi v sistemu 4-metil histamina v vezavnem mestu receptorja pred in po devteriranju. S črno barvo so označene dolžine pred devteriranjem, z rdečo pa po devteriranju. Vse vrednosti so v Å. C_{α} atomi aminokislinskih ostankov, ki so bili med optimizacijo zamrznjeni, so označeni z belimi puščicami.



Slika 26: Razdalja med donorjem in akceptorjem vodika v sistemu 2-metil histamina v vezavnem mestu receptorja pred in po devteriranju. S črno barvo so označene dolžine pred devteriranju, z rdečo pa po devteriranju. Vse vrednosti so v Å. C α atomi aminokislinskih ostankov, ki so bili med optimizacijo zamrznjeni, so označeni z belimi puščicami.

5.3 Prosta energija vezave 2- in 4-metil histamina

Prosta energija vezave je razlika proste energije interakcije in proste energije hidratacije. Eksperimentalnih podatkov o prostih energijah hidratacije in interakcije iz literature nismo mogli pridobiti, lahko pa primerjamo spremembo proste energije vezave. Eksperimentalne podatke za prosto energijo vezave smo dobili iz pIC₅₀ vrednosti za sistem z vodikom in devterijem po naslednji enačbi:

$$\Delta\Delta G_{H \rightarrow D}^{Vezavna} = -2,303 R T [pIC_{50}(H) - pIC_{50}(D)]$$

Enačba 5: Enačba za izračun spremembe proste energije vezave po devteriranju iz vrednosti pIC₅₀. pIC₅₀ je negativni desetiški logaritem polovice maksimalne koncentracije, zato je potreben predfaktor -2,303, ki je ln(10).

Rezultati izračunov za 2- in 4-metil histamin so zbrani v preglednicah VI in VII.

Preglednica VI: Spremembe proste energije hidratacije, interakcije in vezave po devteriranju za 2-metil histamin. Vse vrednosti so v kcal/mol.

	$\Delta G(\text{H}_2\text{O})$	$\Delta G(\text{D}_2\text{O})$	$\Delta\Delta G(\text{H}_2\text{O}-\text{D}_2\text{O})$
$\Delta G_{\text{Hidracijska}}$	-66,92	-66,88	-0,04
$\Delta G_{\text{Interakcijska}}$	-71,99	-69,57	-2,42
$\Delta G_{\text{Vezavna}}$ (izračunana)	-5,07	-2,69	-2,38
$\Delta G_{\text{Vezavna}}$ (eksp., celice)			-2,08
$\Delta G_{\text{Vezavna}}$ (eksp., membrane)			-0,67

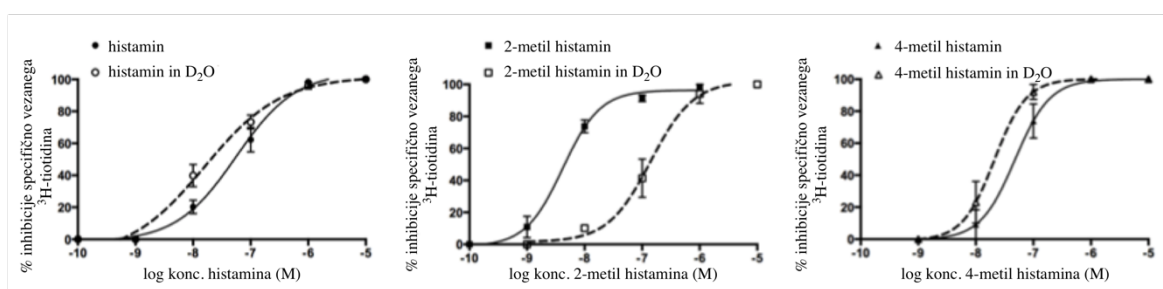
Preglednica VII: Spremembe proste energije hidratacije, interakcije in vezave po devteriranju za 4-metil histamin. Vse vrednosti so v kcal/mol.

	$\Delta G(\text{H}_2\text{O})$	$\Delta G(\text{D}_2\text{O})$	$\Delta\Delta G(\text{H}_2\text{O}-\text{D}_2\text{O})$
$\Delta G_{\text{Hidracijska}}$	-67,38	-67,55	0,17
$\Delta G_{\text{Interakcijska}}$	-86,13	-87,40	1,27
$\Delta G_{\text{Vezavna}}$ (izračunana)	-18,75	-19,85	1,10
$\Delta G_{\text{Vezavna}}$ (eksp., celice)			0,49
$\Delta G_{\text{Vezavna}}$ (eksp., membrane)			1,59

V primeru 2-metil histamina je prosta energija vezave za 2,38 kcal/mol ugodnejša v devteriranem sistemu v primerjavi s sistemom, kjer prevladuje vodik. Ta rezultat boljše sovпада z rezultatom iz eksperimenta na astrocitih novorojenih podgan in sicer je le-ta znašal -2,08 kcal/mol. Efekt devteriranja je manj opazen na izoliranih membranah astrocitov, kjer je znašal -0,67 kcal/mol.

V primeru 4-metil histamina je izračunan vpliv devteriranja 1,10 kcal/mol v korist devteriranemu sistemu, kar je vmes med vrednostima iz eksperimentov, ki sta znašali 0,49 kcal/mol za celice in 1,59 kcal/mol za izolirane membrane.

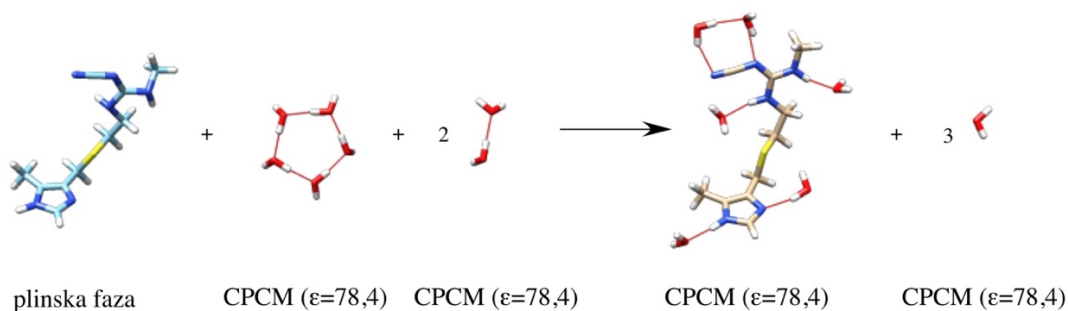
Naši rezultati sovpadajo z eksperimentalnimi rezultati pridobljenih na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo v Ljubljani, kot je razvidno na sliki 27. Po devteriranju se afiniteta 2-metil histamina do histaminskega H₂ receptorja zmanjša, afiniteta 4-metil histamina pa se poveča.



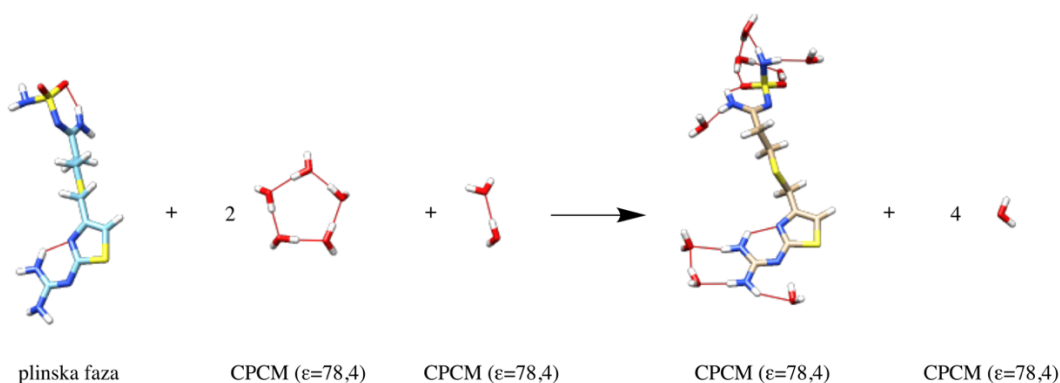
Slika 27: Inhibicija specifično vezanega ³H-tiotidina s histaminom, 2-metil histaminom in 4-metil histaminom v kulturi astrocitov (povzeto po 18).

5.4 Prosta energija hidratacije cimetidina in famotidina

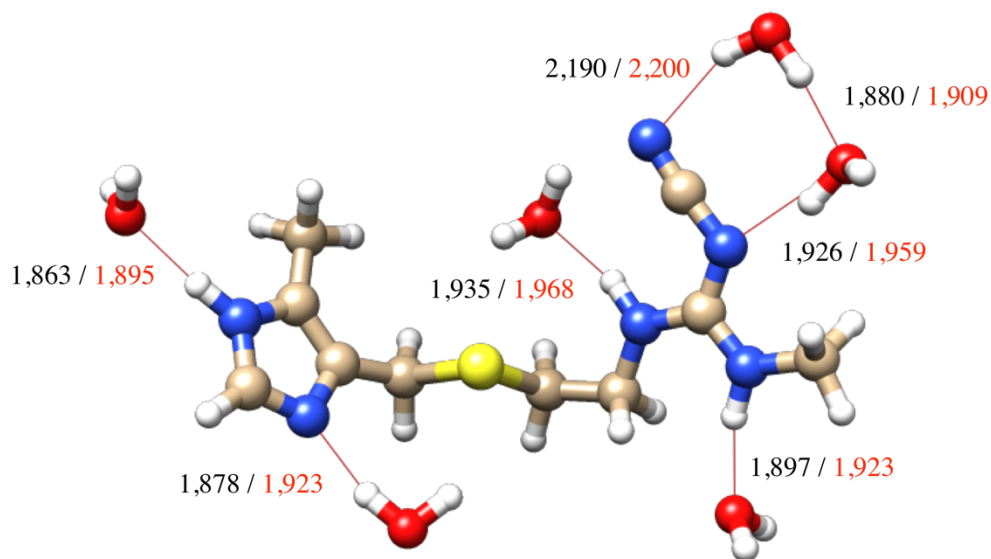
Cimetidin in famotidin imata oba več donorjev oz. akceptorjev vodikove vezi kot histamin ali metilirani derivati histamina, zato smo prej omenjeno računsko shemo za ti dve spojini morali prilagoditi. V ospredju metode je še vedno ostala ohranitev števila vodikovih vezi na levi in desni strani sheme. Uporabljeni shemi sta prikazani na slikah 28 in 29.



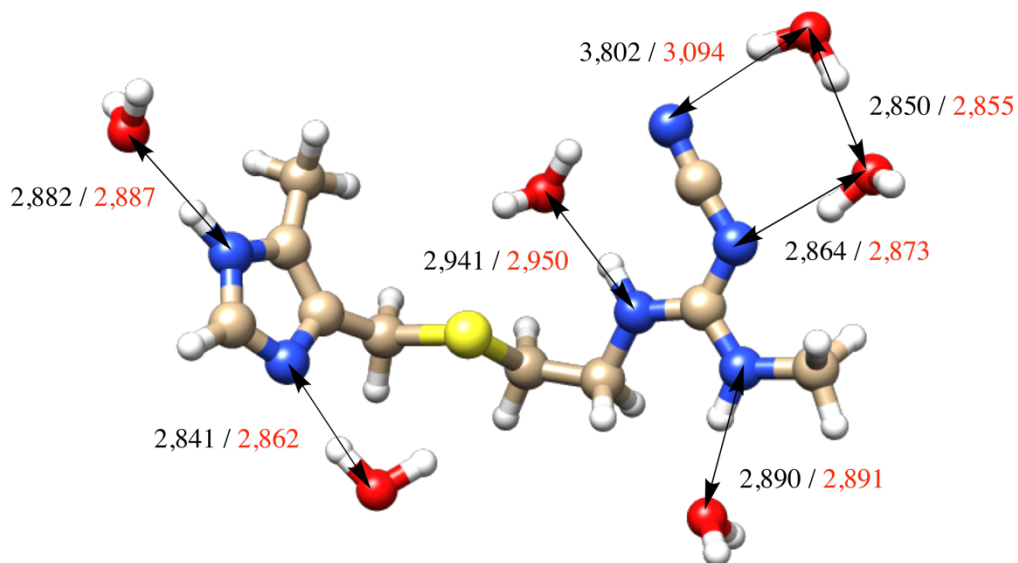
Slika 28: Uporabljena shema za izračun proste energije hidratacije cimetidina. V oklepajih je navedena izbira dielektrične konstante. Na levi strani sheme je cimetidin v plinski fazi, pet molekul vode povezanih v pentamer in dva dimera vode. Na desni strani sheme je cimetidin v interakciji s šestimi molekulami vode in tri proste molekule vode.



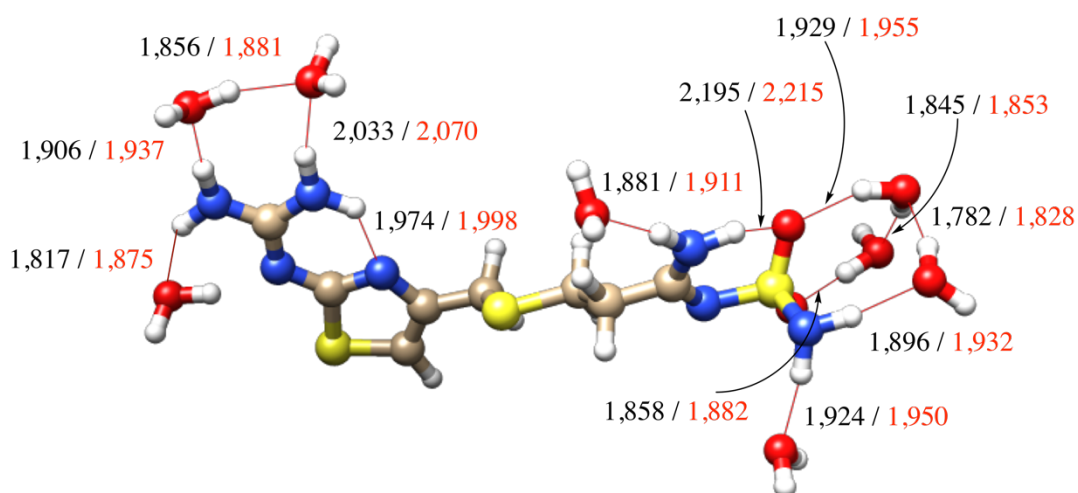
Slika 29: Uporabljena shema za izračun proste energije hidratacije famotidina. V oklepajih je navedena izbira dielektrične konstante. Na levi strani sheme je cimetidin v plinski fazi, dvakrat po pet molekul vode povezanih v pentamer in dimer vode. Na desni strani sheme je cimetidin v interakciji s osmimi molekulami vode in štiri proste molekule vode.



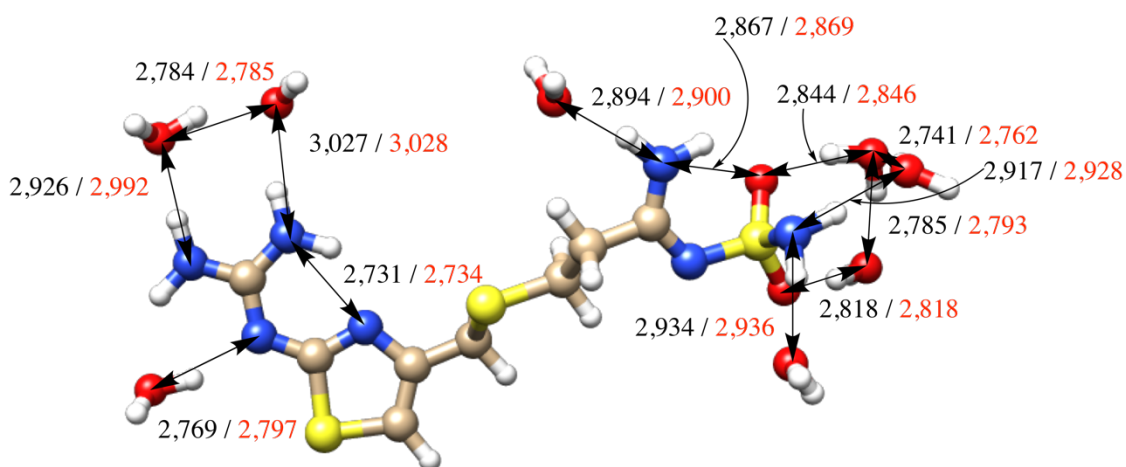
Slika 30: Dolžina vodikovih vezi v sistemu hidratiranega cimetidina pred in po devteriranju. S črno barvo so označene dolžine pred devteriranju, z rdečo pa po devteriranju. Vse vrednosti so v Å.



Slika 31: Razdalja med donorjem in akceptorjem vodikovega atoma v sistemu hidratiranega cimetidina pred in po devteriranju. S črno barvo so označene dolžine pred devteriranju, z rdečo pa po devteriranju. Vse vrednosti so v Å.



Slika 32: Dolžina vodikovih vezi v sistemu hidratiranega famotidina pred in po devteriranju. S črno barvo so označene dolžine pred devteriranju, z rdečo pa po devteriranju. Vse vrednosti so v Å.

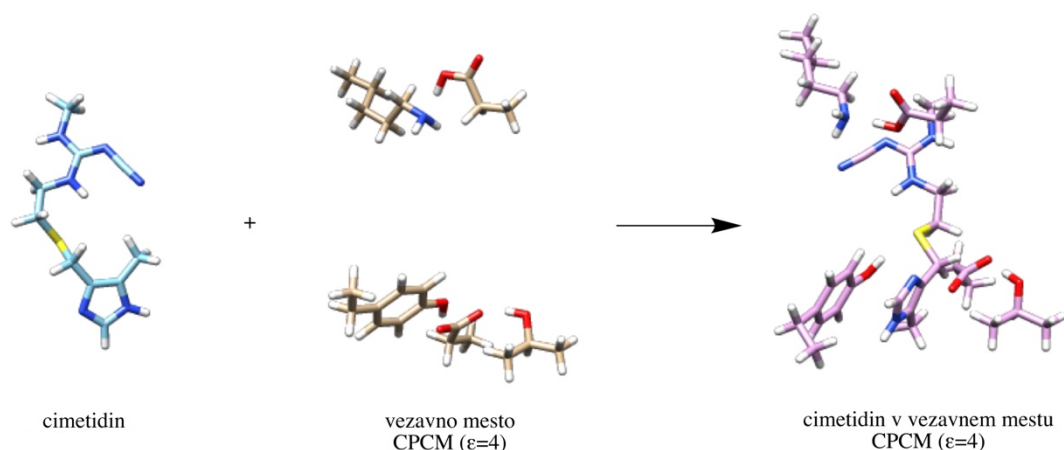


Slika 33: Razdalja med donorjem in akceptorjem vodikovega atoma v sistemu hidratiranega famotidina pred in po devteriranju. S črno barvo so označene dolžine pred devteriranju, z rdečo pa po devteriranju. Vse vrednosti so v Å.

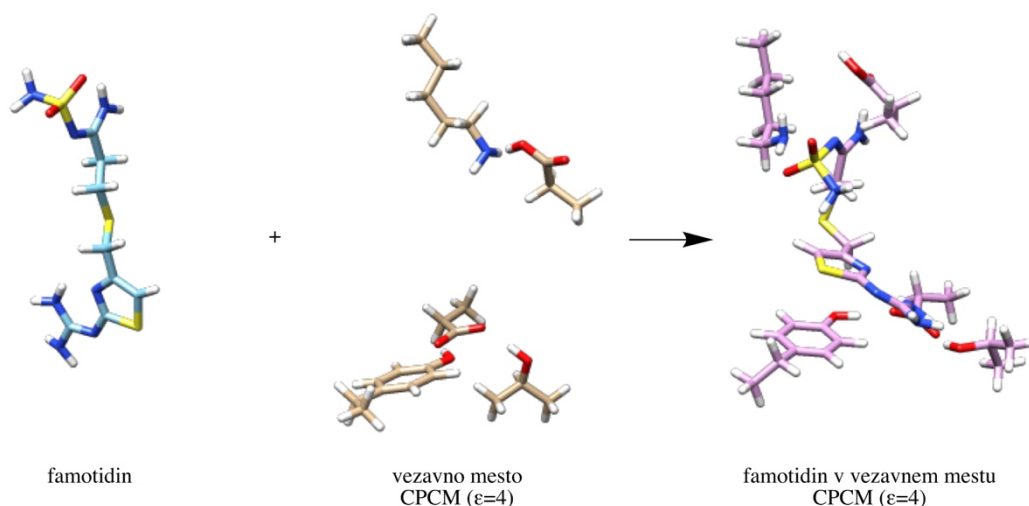
V primeru cimetidina je prosta energija hidratacije znašala -19,69 kcal/mol pred in -19,54 kcal/mol po devteriranju. V primeru famotidina se je prosta energija hidratacije z devteriranjem povečala s -14,29 kcal/mol na -13,97 kcal/mol. Kot vidimo, je v obeh primerih bolj ugodna solvatacija v vodi kot v devterijevem oksidu.

5.5 Prosta energija interakcije cimetidina in famotidina z receptorjem

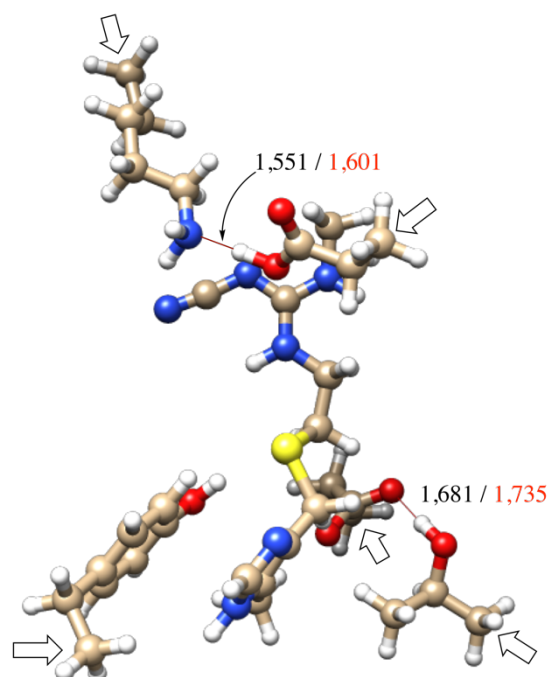
Ker sta cimetidin in famotidin kompetitivna antagonista histaminskega H₂ receptorja, smo uporabili enako vezavno mesto kot v prejšnjih primerih. Glede na velikost molekul cimetidina in famotidina, je bilo pomembno, da smo za vezavno mesto uporabili pet aminokislinskih ostankov, saj smo na tak način lahko natančneje opisali interakcijo. Spodaj sta prikazani shemi za izračun proste energije interakcije.



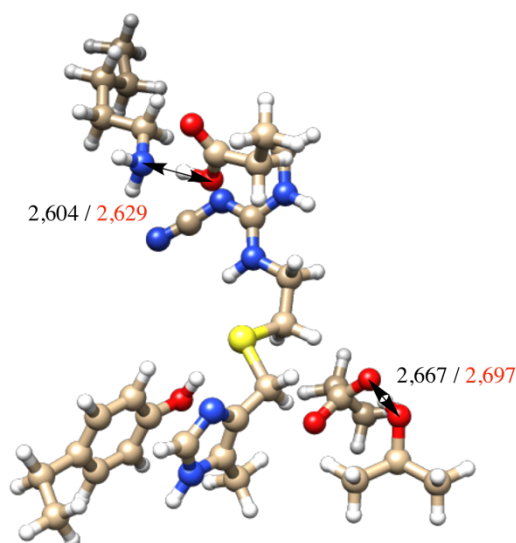
Slika 34: Shema za izračun interakcije med cimetidinom in aminokislinskimi ostanki vezavnega mesta receptorja. Vse strukture so bile optimizirane na nivoju teorije M06-2X/6-31+G(d,p) z reakcijskim poljem topila. Izbira dielektrične konstante je navedena v oklepaju.



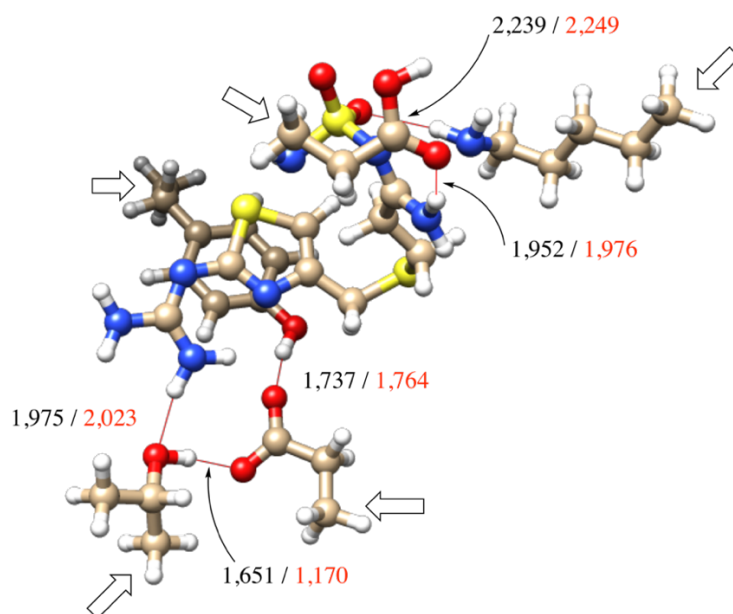
Slika 35: Shema za izračun interakcije med famotidinom in aminokislinskimi ostanki vezavnega mesta receptorja. Vse strukture so bile optimizirane na nivoju teorije M06-2X/6-31+G(d,p) z reakcijskim poljem topila. Izbira dielektrične konstante je navedena v oklepaju.



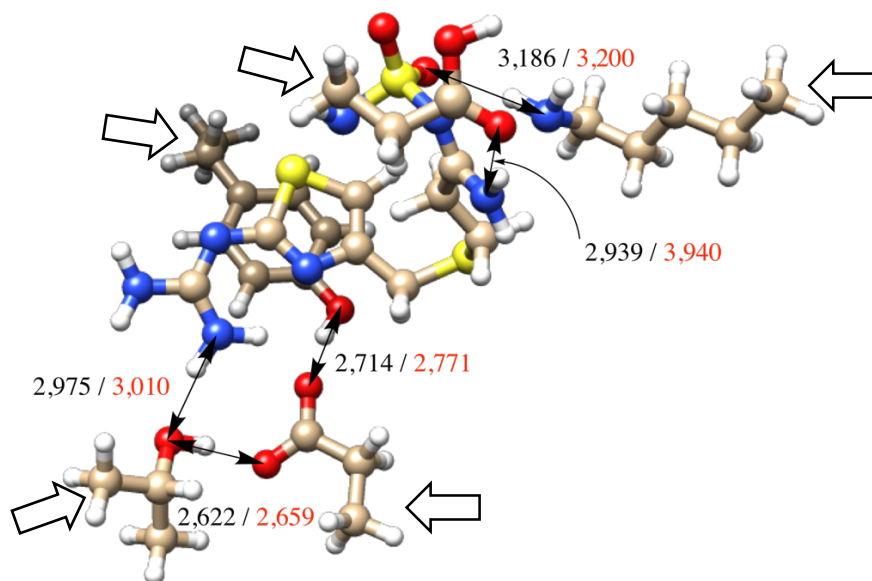
Slika 36: Dolžina vodikovih vezi v sistemu cimetidina v vezavnem mestu receptorja pred in po devteriranju. S črno barvo so označene dolžine pred devteriranju, z rdečo pa po devteriranju. Vse vrednosti so v Å. Z belimi puščicami so označeni C_{α} atomi.



Slika 37: Razdalja med donorjem in akceptorjem vodikovega atoma v sistemu cimetidina v vezavnem mestu receptorja pred in po devteriranju. S črno barvo so označene dolžine pred devteriranjem, z rdečo pa po devteriranju. Vse vrednosti so v Å. Z belimi puščicami so označeni C_{α} atomi.



Slika 38: Dolžina vodikovih vezi v sistemu famotidina v vezavnem mestu receptorja pred in po devteriranju. S črno barvo so označene dolžine pred devteriranjem, z rdečo pa po devteriranju. Vse vrednosti so v Å. C_{α} atomi aminokislinskih ostankov, ki so med optimizaciji bili zamrznjeni, so označeni z belimi puščicami.



Slika 39: Razdalja med donorjem in akceptorjem vodikovega atoma v sistemu famotidina v vezavnem mestu receptorja pred in po devteriranju. S črno barvo so označene dolžine pred devteriranju, z rdečo pa po devteriranju. Vse vrednosti so v Å. Z belimi puščicami so označeni C_{α} atomi.

Prosta energija interakcije je bila pri cimetidinu -27,27 kcal/mol po devteriranju pa -27,21 kcal/mol, kar pomeni da praktično ni bilo spremembe. V primeru famotidina je bila razlika tudi minimalna in sicer je znašala -0,27 kcal/mol – prosta energija interakcije je bila pred devteriranju -32,17 kcal/mol po njem pa -31,90 kcal/mol.

5.6 Prosta energija vezave cimetidina in famotidina

Rezultati izračunov za cimetidin in famotidin so povzeti v preglednicah VIII in IX.

Preglednica VIII: Spremembe proste energije hidratacije, interakcije in vezave po devteriranju za cimetidin. Vse vrednosti so v kcal/mol.

	$\Delta G(\text{H}_2\text{O})$	$\Delta G(\text{D}_2\text{O})$	$\Delta\Delta G(\text{H}_2\text{O}-\text{D}_2\text{O})$
$\Delta G_{\text{Hidratacijska}}$	-19,69	-19,54	-0,15
$\Delta G_{\text{Interakcijska}}$	-27,27	-27,21	-0,06
$\Delta G_{\text{Vezavna}}$ (izračunana)	-7,58	-7,67	0,90
$\Delta G_{\text{Vezavna}}$ (eksp.)			0

Preglednica IX: Spremembe proste energije hidratacije, interakcije in vezave po devteriranju za famotidin. Vse vrednosti so v kcal/mol.

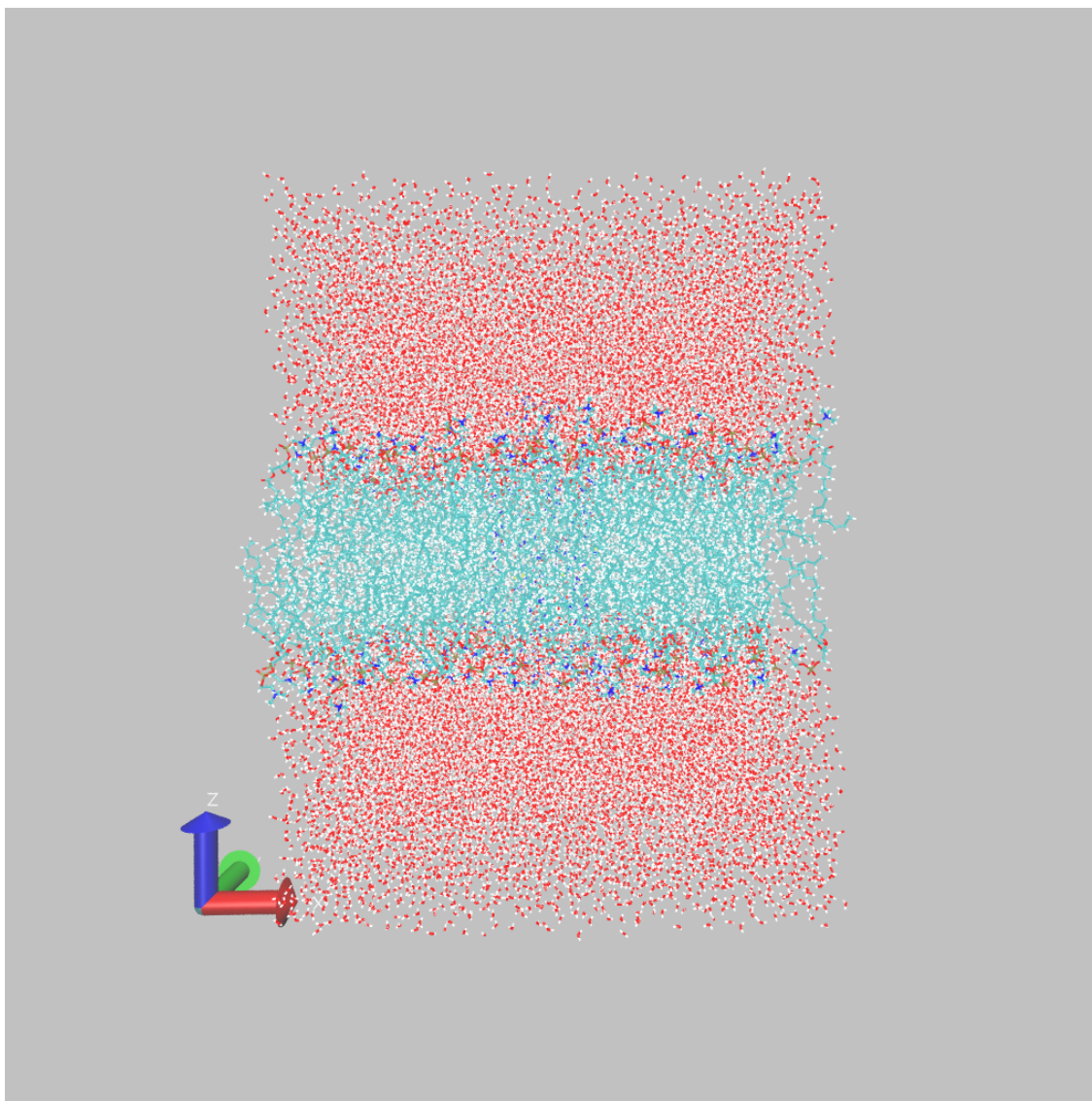
	$\Delta G(\text{H}_2\text{O})$	$\Delta G(\text{D}_2\text{O})$	$\Delta\Delta G(\text{H}_2\text{O}-\text{D}_2\text{O})$
$\Delta G_{\text{Hidratacijska}}$	-14,29	-13,97	-0,32
$\Delta G_{\text{Interakcijska}}$	-32,17	-31,90	-0,27
$\Delta G_{\text{Vezavna}}$ (izračunana)	-17,88	-17,93	0,05
$\Delta G_{\text{Vezavna}}$ (eksp.)			0

Kot je razvidno iz preglednic, k spremembi proste energije vezave v večji meri prispeva sprememba proste energije interakcije – enako kot pri metiliranih analogih histamina.

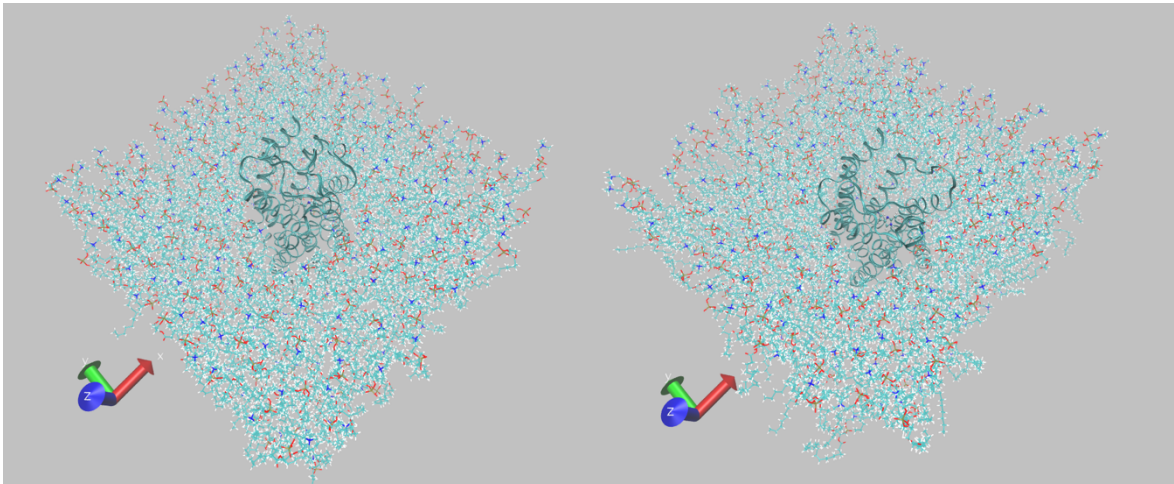
Razlika v prosti energiji vezave je po devteriranju 0,90 kcal/mol za cimetidin in 0,05 kcal/mol za famotidin. Ti rezultati so sprejemljivi, saj iz eksperimentalnih rezultatov izhaja, da se afiniteta teh dveh H₂ antagonistov do receptorja po devteriranju ne spremeni.

5.7 Molekulska dinamika

Naš sistem je vseboval 116.984 atomov, od tega je bilo 26.294 molekul vode in 12 kloridnih ionov (Slika 40). Analiza 40 ns simulacije molekulske dinamike je pokazala, da je struktura receptorja ostala stabilna. Histamin je ostal v vezavnem mestu (Slika 41).

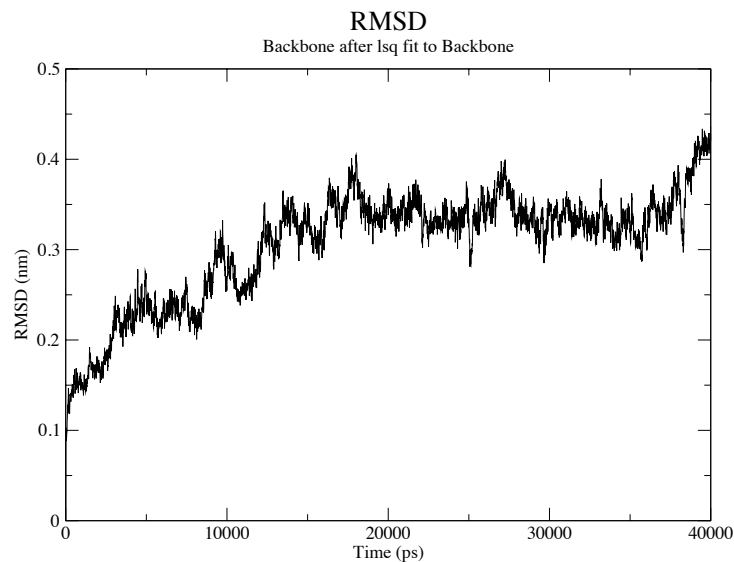


Slika 40: Sistem histaminskega receptorja H₂ v lipidnem dvosloju iz POPC, obdan z vodo.

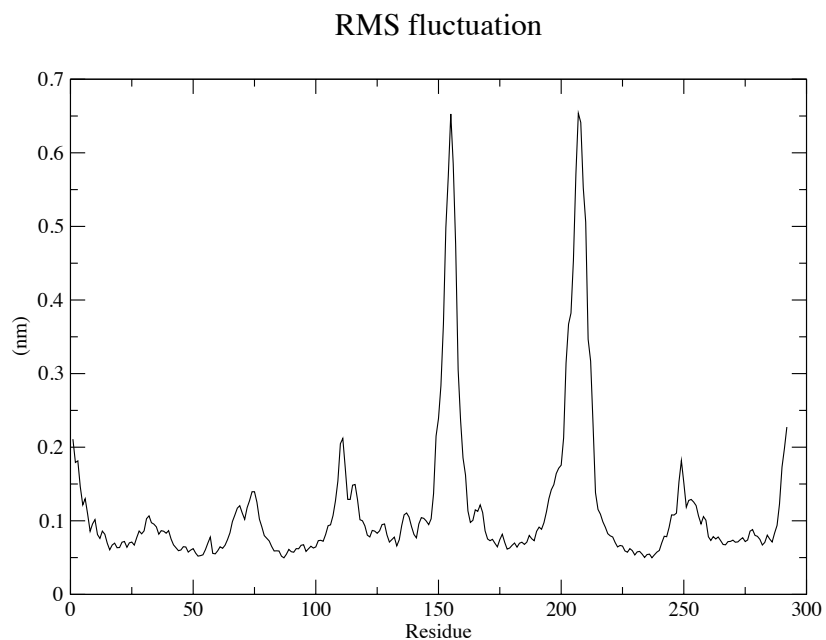


Slika 41: Histaminski H₂ receptor z vezanim histaminom v lipidnem dvosloju POPC na začetku simulacije (levo) in po 40 ns (desno). Zaradi nazornosti molekul vode nismo prikazali.

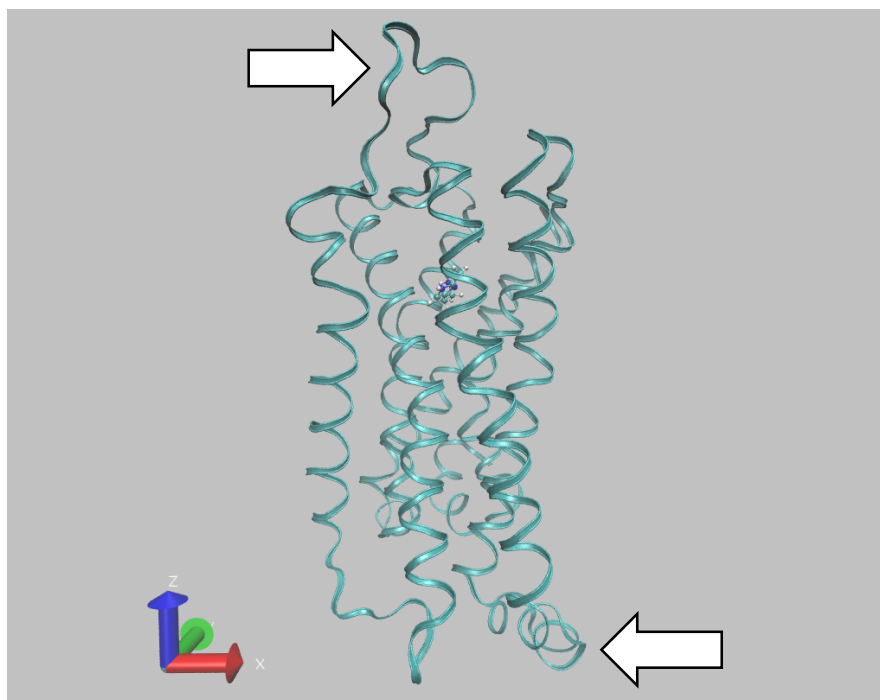
Analizirali smo kvadratni koren povprečnega kvadrata odmikov (RMSD) glede na čas in na aminokislinski ostanek. RMSD na začetku narašča približno 15 ns, kar je normalno za modelirane strukture, saj se v tem obdobju sprosti napetost sistema. Proti koncu simulacije začne RMSD spet naraščati (Slika 42). Za razlago tega pojava bi rabili daljšo simulacijo. Za razumevanje konformacijskih sprememb pri aktivaciji receptorjev bi bile zaželjene simulacije na mikrosekundni skali, kar pa nam trenutno omejuje sposobnost računalnikov.



Slika 42: Kvadratni koren povprečnega kvadrata odmikov v nm glede na čas simulacije.



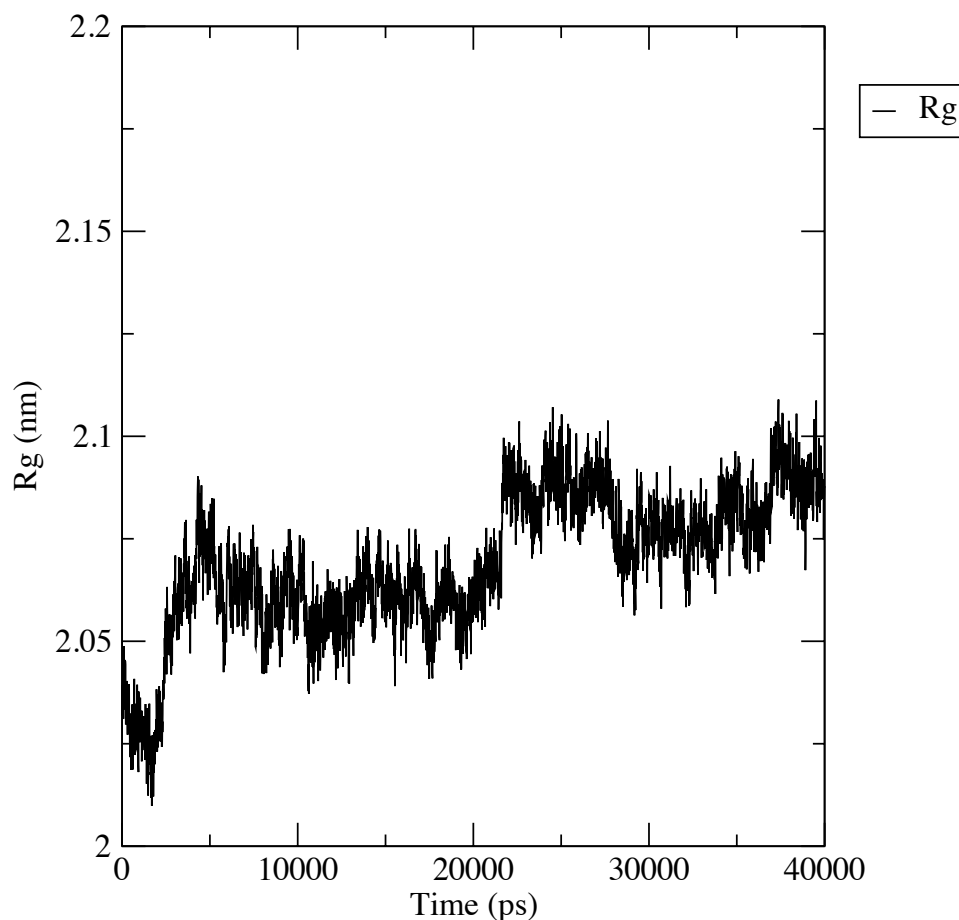
Slika 43: Kvadratni koren povprečnega kvadrata odmikov v nm glede aminokislinski ostanek. Rezultati kažejo večje fluktuacije na delih receptorja izpostavljenih vodni raztopini.



Slika 44: Histaminski H₂ receptor z vezanim histaminom. S puščicami sta označeni zanki, ki sta glede na sliko 43 tekom simulacije bili najbolj gibljivi.

Ugotovili smo, da sta najbolj gibljivi zanki, ena na zunanjski in ena na znotrajcelični strani (Slika 44 in Slika 45).

Radius of gyration



Slika 45: Radij sukanja v nm glede na čas poteka simulacije

Izračunali smo radij sukanja (Slika 45), ki nam pove, ali se med simulacijo protein začne razvijati. Po začetnem porastu, ostaja radij sukanja dokaj konstanten. V splošnem je vrednost radija sukanja denaturiranega proteina približno dvakrat večja v primerjavi s pravilno zvitim proteinom.

Zaključimo, da je histaminski H₂ receptor v lipidnem dvosloju iz POPC stabilen v časovnem obdobju 40 ns in se ne razvije. Prav tako histamin v tem času ostane v vezavnem mestu. Za bolj točne rezultate bi bile potrebne daljše simulacije (na mikrosekundni skali), kar pa dostopna strojna oprema ne dopušča. Prav tako bi bila potrebna kvantizacija gibanja jeder. Za proučevanje nuklearnih kvantnih efektov obstaja metoda integracije po poti (angl. *path integration*), ki pa za simulacijo nuklearnih kvantnih efektov receptorjev še ni bila uporabljena.

6 Sklep

Z obravnavanjem nuklearnega kvantnega efekta smo potrdili, da je vodikova vez izredno pomembna za interakcijo liganda v vezavnim mestom receptorja in prav tako v interakciji z vodo. Vezava liganda na histaminski receptor H_2 ima kvantni značaj. Zamenjava vodika za devterij povzroči spremembo razdalj med atomi, tako intramolekularno kot intermolekularno. Le-to spremeni vezavne lastnosti liganda in prav tako stabilnost strukture makromolekul ter topnosti.

V magistrskem delu smo s pomočjo metod računske kemije pokazali, da lahko napovemo, kako bo devteriranje vplivala na afiniteto ligandov do histaminskega H_2 receptorja. Po devteriranju se afiniteta 2-metil histamina do histaminskega H_2 receptorja zmanjša, afiniteta 4-metil histamina se poveča, afiniteti H_2 -antagonistov cimetidina in famotidina pa se ne spremeni. Pokazali smo tudi, da je za vezavo ligandov prosta energija interakcije ligand-receptor pomembnejša od proste energije hidratacije liganda.

Pokazali smo da je sprememba geometrije in energije vodikove vezi kvantne narave in nima klasičnega analoga. Zdravilne učinkovine, ki imajo na elektronegativni atom vezani devterij ne bodo vstopile v klinično uporabo, saj se devteroni na učinkovini zamenjajo s protoni iz okolice (npr. vode, proteinov), preden učinkovina doseže svojo tarčo. Kljub temu je uporabljen pristop sposoben kot raziskovalno orodje za proučevanje mehanizma vezave liganda na receptor.

Vseh zastavljenih hipotez nismo mogli potrditi, izračunali pa smo:

- Prosta energija hidratacije se po devteriranju poveča v primeru 2-metil histamina, cimetidina in famotidina, v primeru 4-metil histamina pa se zmanjša.
- Prosta energija interakcije ligand-receptor se po devteriranju poveča v primeru 2-metil histamina, cimetidina in famotidina, v primeru 4-metil histamina pa se zmanjša.
- Afiniteta 2-metil histamina do histaminskega H_2 receptorja se po devteriranju poveča, v primeru 4-metil histamina se zmanjša, v primeru cimetidina in famotidina pa ostane približno enaka.

7 Literatura

1. Hall JE: Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology, 13th Edition, Saunders, Philadelphia, 2016: 930–937.
2. Rang HP, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G: Rang & Dale's Pharmacology, 8th Edition, Churchill Livingstone, Edinburgh, 2015: 25-44.
3. Proft J, Weiss N: G Protein Regulation of Neuronal Calcium Channels: Back to the Future. *Molecular pharmacology* 2014; 87(6): 890-906.
4. "Inverse agonist." Wikipedia: The Free Encyclopedia. Wikimedia Foundation, Inc., 18.9.2012. Dosegljivo na: http://en.wikipedia.org/wiki/Inverse_agonist. Dostop: 7.6.2017.
5. Kraus A: Hihly Potent, Selective Acylguanidine-Type Histamine H2 Receptor Agonists: Synthesis and Structure-Activity Relationships, doktorska disertacija, Naturwissenschaftlichen Fakultät IV, Universität Regensburg, 2007: 6-7.
6. Kubas H, Stark H: Medizinische Chemie von Histamin-H2-Rezeptorantagonisten: Klassische Wirkstoffentwicklung. *Pharmazie in unserer Zeit* 2006; 36(1): 24-32.
7. Lodish HF: *Molecular Cell Biology*, 7th Edition, W.H. Freeman and Co, New York, 2013: 24-32.
8. Kenakin TP: *A Pharmacology Primer: Theory, Application and Methods*, 4th Edition, Elsevier Academic Press, San Diego, 2014: 63-71.
9. Brenčič J, Lazarini F: Splošna in anorganska kemija, 3. izdaja, DZS, Ljubljana, 2011: 55, 133-138
10. Stare J: Dinamika in struktura sistemov s kratkimi vodikovimi vezmi, Doktorska disertacija, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2003.
11. Efimova YM, Haemers S, Wierczinski B, Norde W: Stability of GlobularProteins in H₂O and D₂O. *Biopolymers*, 2007; 85: 264-73.
12. de Souza JM, Freire PTC, Bordallo HN, Argyriou DN: Structural isotopic effects in the smallest chiral amino acid: Observation of a structural phase transition in fully deuterated alanine. *J Phys Chem B* 111, 2007: 5034–9.
13. Milonni PW: *The Quantum Vacuum: An Introduction to Quantum Electrodynamics*, Academic Press, Boston, 1994: 35
14. Heermann DW: *Computer Simulation Methods in Theoretical Physics*, Springer Verlag, Heidelberg, 1986: 9-10

15. Ávila AF, Lacerda GSR: Molecular Mechanics Applied to Single-Walled Carbon Nanotubes, *Materials Research* 11(3), 2008: 325-333
16. Cramer CJ: *Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models*, 2nd Edition, Wiley, West Sussex, 2004: 17-18, 457-458
17. Hehre WJ: *A Guide to Molecular Mechanics and Quantum Chemical Calculations*, Wavefunction, Inc., Irvine, 2003: 21-24
18. Kržan M, Vianello R, Maršavelski A, Repič M, Zakšek M, Kotnik K, Fijan E, Mavri J: The Quantum Nature of Drug-Receptor Interactions: Deuteration Changes Binding Affinities for Histamine Receptor Ligands. *PLoS One*, 2016; 11(5): e0154002-1-e0154002-16.
19. Birdsall NJM: Cloning and structure: function of the H2 histamine receptor. *Trends Pharmacol Sci*, 1991; 12: 9-10
20. Jantratid E, Prakongpan S, Dressman JB, Amidon GL, Junginger HE, Midha KK, Barends DM (2006) Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: cimetidine. *J Pharm Sci* 95(5):974-84
21. Islam MS, Narurkar MM (1993) Solubility, stability and ionization behaviour of famotidine. *J Pharm Pharmacol* 45(8):682-6
22. Liao RZ, Georgieva, Yu JG, Himo F: Mechanism of myolic acid cyclopropane synthase: a theoretical study. *Biochemistry* 2011; 50: 1505-1513
23. Vianello R, Mavri J: Microsolvation of the histamine monocation in aqueous solution: the effect on structure, hydrogen bonding ability and vibrational spectrum. *New J Chem* 2012, 36: 954-62
24. Service RF: Nobel Prize in chemistry. Receptor scientists to receive chemistry Nobel. *Science* 2012, 338(6105):313-4