

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATEJ REPIČ

**RAČUNALNIŠKO MODELIRANJE IREVERZIBILNE
INHIBICIJE ENCIMA MONOAMIN-OKSIDAZE B**

**COMPUTER MODELING OF IRREVERSIBLE
MONOAMINE OXIDASE B INHIBITION**

Ljubljana, 2010

Diplomsko naložbo sem opravljala na Kemijskem inštitutu pod mentorstvom izr. prof. dr. Mojce Kržan. in doc. dr. Janeza Mavrija.

Zahvaljujem se mentorjema za izdatno strokovno in materialno podporo pri izdelovanju in pisanju diplomske naloge. Še posebej se zahvaljujem Roku Borštnarju za obilo koristnih napotkov pri izračunih ter ostalim članom laboratorija L1 na Kemijskem inštitutu za zabavne polstrovkovne pogovore. Hkrati gre zahvala tudi vsem učiteljem na FFa, ki so me skozi leta naučili potrebnega znanja in discipline za uspešno dokončanje študija. Zahvalil bi se še vsem slovenskim davkoplačevelcem, ki so me med študijem finančno podpirali in mi omogočili brezplačen študij. Nenazadnje bi se za materialno in duhovno podporo v letih študija še posebej zahvalil Heleni, Juriju, Barbari, Mateju, Petri in Alešu. Hvala vsem!

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko naložbo samostojno izdelal pod mentorstvom izr. prof. dr. Mojce Kržan in doc. dr. Janeza Mavrija.

Vsebina

Uvod	1
1.Centralni živčni sistem	1
2.Podobnost CŽS z računalnikom	3
3.Bazalni gangliji	5
3.1.Direktna pot	7
3.2.Indirektna pot	7
4.Neurotransmisija	8
4.1.Sinaptični prenos	9
4.2.Ekstrasinaptični prenos	10
4.3.Transmembranski receptorji	10
4.4.Neurotransmiterji	12
4.4.1.Sinteza	13
4.4.2.Skladiščenje	13
4.4.3.Sproščanje	13
4.4.4.Inaktivacija	14
5.Vloga dopamina v CŽS	15
5.1.Sinteza in skladiščenje	15
5.2.Dopaminergične poti v CŽS	16
5.3.Inaktivacija dopamina	17
5.3.1.Ponovni privzem	17
5.3.2.Metabolizem	18
5.3.3.Katehol O-metil transferaza	18
5.3.4.Monoamin-oksidaza	19
6.Lastnosti humane MAO	20
6.1.Razporeditev po tkivih	21
6.2.Struktura in aktivno mesto	21
6.3.Mehanizem delovanja MAO	24
7.SAR acetilenih inhibitorjev	27
8.Mehanizmi inhibicije MAO	29
Namen dela in delovne hipoteze	31
Metode	32
9.Strojna oprema	32
10.Programska oprema	32
10.1.Molden	32
10.2.Vhodna datoteka za Gaussian	33
10.3.Gaussian 03	33
11.Izračuni kemijske reaktivnosti	34
Rezultati in razprava	37
Sklep	40
Literatura	42

Kazalo slik, preglednic in enačb

Slika 01 - Anatomska delitev centralnega živčnega sistema	1
Slika 02 - Razdelitev centralnega živčnega sistema pri človeku	2
Slika 03 - Anatomija bazalnih ganglijev in njihove nevronske povezave	6
Slika 04 - Diagram patologije Parkinsonove bolezni	7
Slika 05 - Aktivnosti v sinapsi	8
Slika 06 - Primer zunajsinaptičnega prenosa	9
Slika 07 - Tipi transmembranskih receptorjev glede na efektorski sistem	11
Slika 08 - Sintezne in razgradnje poti dopamina	15
Slika 09 - Dopaminergične poti v centralnem živčnem sistemu	17
Slika 10 - Dimer MAO-B v zunanjih mitohodrijskih membranah	20
Slika 11 - Struktura MAO-B	22
Slika 12 - Aromatska kletka in orientacija tirozinskih ostankov	23
Slika 13 - Številčenje flavina	24
Slika 14 - Miller-Edmondsonov polarni nukleofilni mehanizem	25
Slika 15 - Silvermanov radikalni mehanizem	26
Slika 16 - Struktura prototipnega acetilenskega (propargilaminskega) inhibitorja MAO	27
Slika 17 - Rezultat NMR analize strukture acetilenskega inhibitorja s flavinom	29
Slika 18 - Možni mehanizmi nastanka adukta med acetilenskim inhibitorjem in flavinom	30
Slika 19 - Predpostavljen acetylilidni mehanizem	31
Slika 20 - Primer vhodne datoteke za Gaussian	33
Slika 21 - Diagram teorije prehodnega stanja	35
Slika 22 - Izračunane energije sistema flavin in rasagilina na STO-3G nivoju	37
Slika 23 - Optimizirana struktura reaktantov	38
Slika 24 - Optimizirana struktura v okolini prehodnega stanja	38
Slika 25 - Optimizirana struktura produkta	39
<hr/>	
Preglednica I - Primerjava centralnega živčnega sistema in računalnika	4
Preglednica II - Nevrotransmiterji v bazalnih ganglijih in njihovi učinki	12
Preglednica III - Primerjava med izoblikama MAO	19
Preglednica IV - Najpogosteje uporabljeni acetilenski inhibitorji MAO	28
Preglednica V - Specifikacije relevantne strojne in programske opreme računalnika	32
<hr/>	
Enačba 1 - Splošna reakcija MAO katalize	20
Enačba 2 - Enačba za izračun Gibbsove proste energije aktivacije iz konstante hitrosti reakcije	31
Enačba 3 - Enačba za izračun konstante reakcije iz Gibbsove proste energije aktivacije	31
Enačba 4 - Splošna stacionarna, časovno neodvisna Schrödingerjeva enačba	34
Enačba 5 - Enačba za izračun proste energije aktivacije v topilu	36
Enačba 6 - Enačba za izračun konstante reakcije za eno molekulo iz Gibbsove proste energije aktivacije	36

Seznam okrajšav

okrajšava	pomen
AMPA	alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (alfa-amino-3-hidroksi-5-metilizoksazol-4-propionska kislina)
AADC	aromatic amino acid decarboxylase (dekarboksilaza aromatskih aminokislin)
AM1	Austin model 1
BO	Born-Oppenheimer
CŽS	centralni živčni sistem
CM	centromedialno jedro talamus
cAMP	ciklični adenozin monofosfat
DAG	diacilglicerol
DDC	DOPA dekarboksilaza
DAT	dopaminski transporter
EPR	elektronska paramagnetna resonanca
FAD	flavinadenindinukleotid
GPCR	G-protein coupled receptor (receptor, sklopljen s proteinom G)
GABA	gama-aminobutirna kislina
GPe	globus pallidus externus (eksterni globus palidus)
GPi	globus pallidus internus (interni globus palidus)
HF	Hartree-Fock
IP3	inozitoltrifosfat
COMT	catehol-O-methyl transferase (catehol O-metil transferaza)
L-DOPA	L-dihydroxyphenylalanine (levodihidroksifenilalanin)
MAO	monoamin-oksidaza
NMDA	N-metil D-aspartat
nACh	nikotinski acetiholinski receptor
NET	noradrenalinski transporter
NMR	nuklearna magnetna resonanca
PM3	Parameterized model 3
QM/MM	quantum mechanics / molecular mechanics (kvantna mehanika / molekulska mehanika)
R-PAI	R-propargilaminoindan
R	reaktanti
SET	single electron transfer (prenos enega elektrona)
STO-3G	Slater-type orbital - 3 Gaussians
SNpc	substanca nigra pars compacta
SNpr	substanca nigra pars reticulata
STN	subtalamično jedro
TH	tirozin hidroksilaza
TS	transition state (prehodno stanje)
UV	ultravijolična spektroskopija
VA/VL	ventroanteriorno / ventrolateralno jedro talamus
VMAT2	vesicular monoamine transporter 2 (vezikularni monoaminski transporter 2)
ZPE	zero point energy (energija ničelnega vibracijskega nivoja)

Povzetek

Monoamin-oksidaza B je encim, ki vsebuje flavin, nahaja pa se na zunanji mitohondrijski membrani nevronov, celic glije in trombocitov ter igra pomembno vlogo v metabolizmu živčnega prenašalca dopamina. Znano je, da pri Parkinsonovi bolezni pride do propada nigrostriatnih dopaminergičnih nevronov in posledično do premajhne dopaminergične stimulacije bazalnih ganglijev, ki so odgovorni za koordinacijo hotenega gibanja, zaradi česar se pojavijo motnje motorike in drugi simptomi Parkinsonove bolezni. Selektivni ireverzibilni inhibitor rasagilin z zaviranjem razgradnje dopamina zvišuje njegov nivo v bazalnih ganglijih in s tem pripomore k izboljšanju simptomov Parkinsonove bolezni. Natančen mehanizem nastanka kovalentnega adukta med flavinom v monoamin-oksidazi in rasagilinom ni znan, zato smo predpostavili acetinilidni mehanizem. S programom za kvantno-kemijске izračune Gaussian 03 smo konstruirali energijski profil za reakcijo ter izračunali prosto energijo aktivacije. Rezultate smo primerjali z eksperimentalno vrednostjo in ugotovili, da je glede na razliko v prosti energiji acetinilidni mehanizem inhibicije verjeten.

Abstract

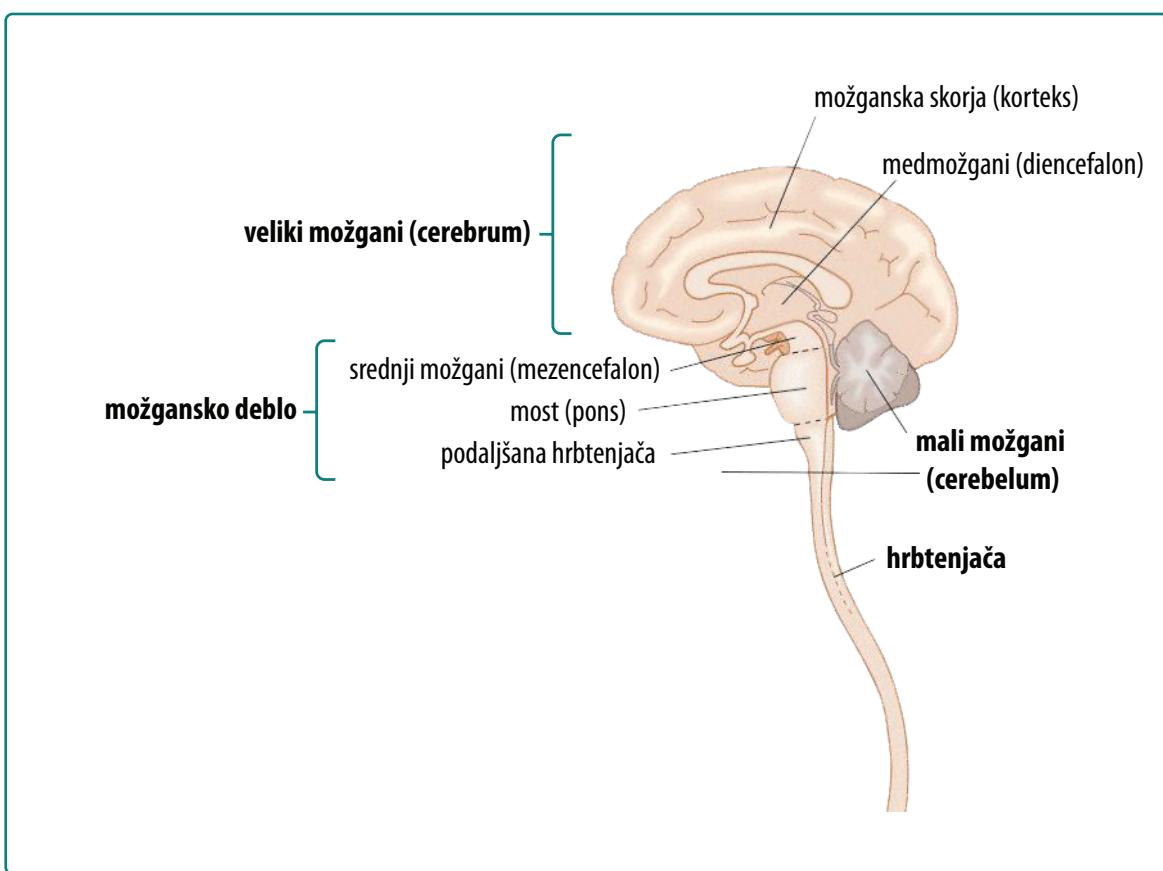
Monoamine oxidase B is a flavoenzyme located in the outer mitochondrial membrane of neurons, glial cells and platelets, which plays an important role in dopamine metabolism. Parkinson's disease is a consequence of diminished dopaminergic stimulation of the basal ganglia caused by loss of nigrostriatal dopaminergic neurons. This gives rise to motor disturbances and other symptoms associated with Parkinson's disease. Selective irreversible inhibition of monoamine oxidase B by rasagiline can relieve these disturbances by lowering the rate of dopamine metabolism and therefore elevating its basal ganglia concentration. Since the exact mechanism of monoamine oxidase flavin-rasagiline adduct formation is unknown, we proposed an acetylinide mechanism. Reaction diagram was constructed from Gaussian 03 free energy calculations. From the diagram, we were able to derive the free energy of activation, which was somewhat comparable to the experimental value. On this basis, we were able to conclude, that the acetylinide mechanism of adduct formation is feasible.

Uvod

1. Centralni živčni sistem

Centralni živčni sistem (CŽS) povezuje, shranjuje in koordinira odzive na ogromno število informacij, ki jih neprestano zaznava v telesu in okolini. Resničnost, ki jo živimo, ustvarjajo avtonomni in somatski živčni procesi, ki ovrednotijo situacijo na podlagi trenutnih senzornih informacij in preteklih izkušenj. Rezultat in namen teh procesov je ustrezen odziv na stanje v telesu in izven njega [1].

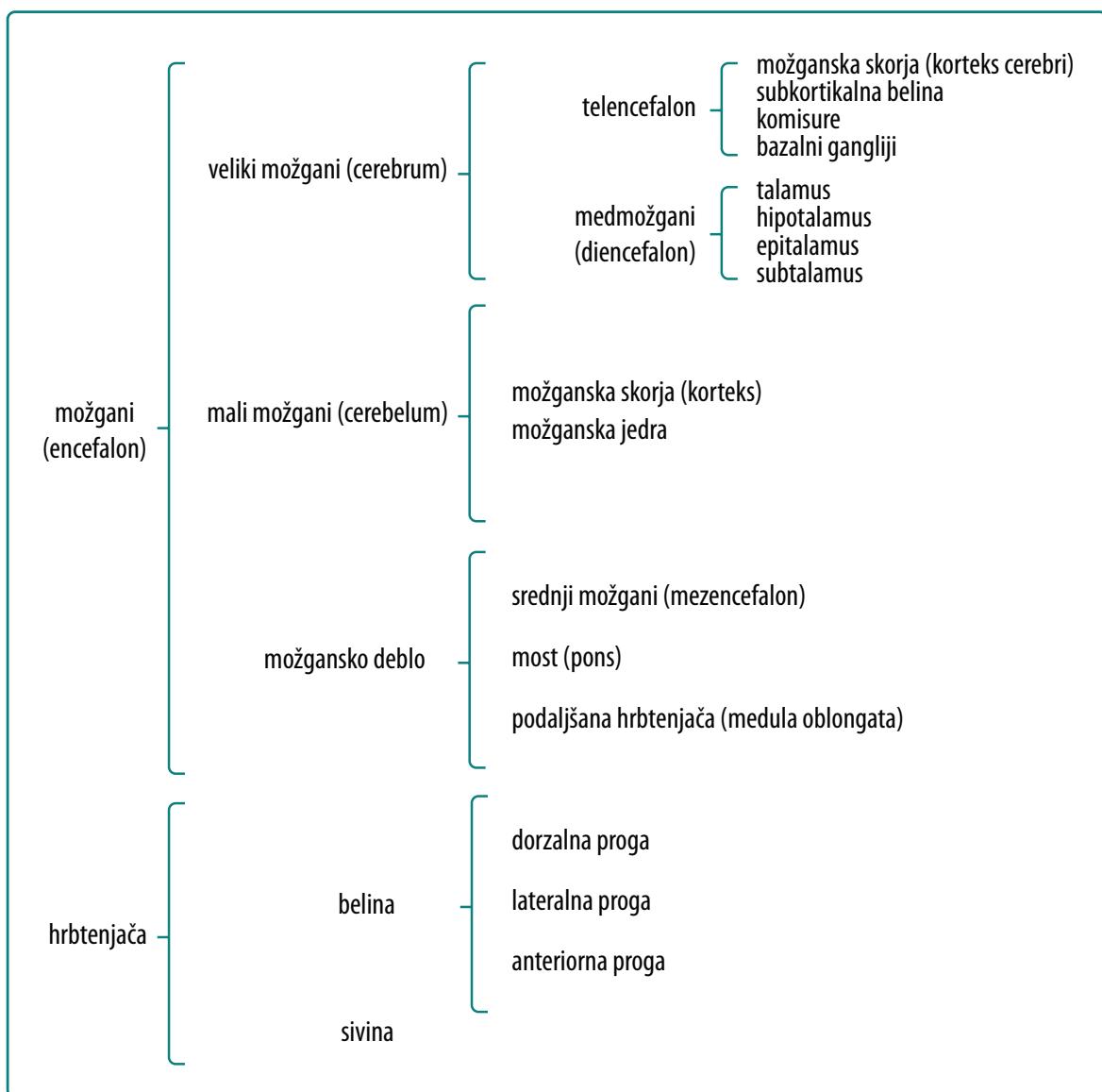
Obdelavo informacij v CŽS lahko funkcionalno razdelimo na tri nivoje. Prvi in najosnovnejši nivo je hrbtenjača, ki ima vlogo pri hoji in refleksih. Najbolj raziskan je t.i. refleks umika, ki skrbi za umik telesa od vira bolečine (vroč predmet, igla). Drugi refleksi, za katere je odgovorna hrbtenjača, so drža telesa, tonus proksimalnega hrbtenjačnega žilja, črevesna peristaltika in krčenje mehurja.



Slika 1 - Anatomska delitev centralnega živčnega sistema. Prijejeno po [1].

Največje anatomske enote centralnega živčnega sistema so veliki možgani, mali možgani, možgansko deblo in hrbtenjača. Te enote se delijo na manjša področja, kot je mezencefal, most, podaljšana hrbtenjača, diencefal in druge, ki na sliki niso prikazane. Vsako izmed teh področij se naprej deli na posamezna jedra, kjer so prisotna telesa nevronov. Primer takega jedra sta substantia nigra v mezencefalu ali talamus v diencefalu.

Drugi nivo je subkortikalni in opravlja večino nezavednih homeostatskih funkcij v telesu. Nadzor teh funkcij opravlja jedra v podaljšani hrbtniči, mostu, medmožganih, hipotalamusu, talamu, malih možganih in bazalnih ganglijih. Aktivnost teh jader uravnava krvni tlak, osmolarnost zunajcelične tekočine, telesno temperaturo, ravnotežje, požiranje, bruhanje, proizvajanje sline in druge nezavedne funkcije. Druga pomembna funkcija subkortikalnih jader je koordinacija med kortikalnimi možganskimi centri. Tako na primer striatum prejema informacije iz frontalnega korteksa in jih prek talamusa posreduje v motorični center možganske skorje. Na subkortikalnem nivoju se nahajajo tudi jeda, ki igrajo vlogo v čustveni percepциji zunanjih dražljajev in oblikujejo odziv na bolečino, ugodje in spolne dražljaje.



Slika 2 - Razdelitev centralnega živčnega sistema pri človeku. Prijeljeno po [1].

Najvišji funkcionalni nivo človeških možganov je možganska skorja. Korteks je center, kjer se oblikujejo misli in je hkrati ogromna podatkovna baza, katere delovanje koordinirajo nižji nivoji, predvsem subkortikalni nivo. Ta sproža aktivnost korteksa in omogoča kompleksno sodelovanje med možganskimi centri. Kljub relativni neodvisnosti subkortikalnega nivoja od korteksa je samostojno delovanje nenatančno in neuporabno za običajne človeške aktivnosti [2].

2. Podobnost CŽŠ z računalnikom

Tema tega diplomskega dela so računalniške simulacije, ki nam omogočajo, da brez praktičnega preizkušanja predvidimo lastnosti molekul in interakcije med njimi. Na podlagi rezultatov simulacije se nato lahko odločimo, katera molekula je najbolj smiseln kandidat za sintezo in preizkušanje.

Človeku predvidevanje (simuliranje) in odločanje omogočajo možgani. V splošnem lahko proces simuliranja strnemo v tri stopnje. Na začetku izberemo relevantne vhodne podatke, nato jih obdelamo v skladu z izbranimi algoritmi, na koncu pa dobimo rezultat. Pri človeku služijo kot vhodni podatki senzorične informacije iz čutil in živčnih končičev ter predhodno pridobljeno znanje. Na zavednem (somatskem) nivoju nam analiza trenutne situacije na podlagi predhodnega znanja omogoča simuliranje prihodnosti. Od rezultata te simulacije je odvisen posameznikov odziv na dane okoliščine. Preprost primer je opazovanje žogice, ki se kotali po mizi. Človek s pomočjo vida zazna smer in hitrost premikanja žogice ter na podlagi predhodnega znanja o vplivu teh dveh faktorjev oceni, da bo žogica padla z mize. Izkušnje pravijo, da padec žogice z mize nima slabih posledic, zato se človek odloči, da padca ne bo skušal preprečiti. V primeru kotalečega se kozarca bi bil odziv najbrž drugačen, saj ima padec kozarca z mize znane negativne posledice.

Avtonomni nivo je preprostejši, zato govorimo o refleksihi. Na avtonomnem nivoju ni simuliranja in odločanja, temveč gre le za avtomatsko sprožitev mehanizmov, ki ob zaznavi odstopanja nekega parametra poskrbijo, da se ta popravi na normalno vrednost.

Rezultat somatske obdelave informacij je vedno izražen preko skeletnih mišic, naj gre za govor, izraz na obrazu ali večji premik telesa. Poleg tega je rezultat lahko tudi nova informacija, ki se shrani v spomin. Avtonomni odziv je za razliko lahko izražen preko gladkih mišic in izločanja eksokrinih ali endokrinih žlez.

Tudi za računalnik bi lahko rekli, da ima somatski in avtonomni živčni sistem. Avtonomni del (jedro operacijskega sistema) skrbi za to, da je dostop do procesorja, spomina in ostale strojne opreme pravilno razporejen med zagnanimi aplikacijami, kar je za uporabnika popolnoma transparentno in mu za to ni potrebo skrbeti. Ravno tako somatski del možganov ni obremenjen s funkcijami, ki jih izvaja avtonomni del.

Te podobnost med človeškim živčnim sistemom in računalnikom nakazujejo na to, da je CŽS v svojem bistvu računalnik, ki neprestano zbira senzorične informacije in jih skupaj s shranjenimi informacijami uporablja za raznolike aktivnosti telesa [2].

Preglednica I - Primerjava centralnega živčnega sistema in računalnika.

Iz preglednice je razvidno, da je podobnost v zasnovi centralnega živčnega sistema in računalnika izjemna. To ni naključje, saj sta tako CŽS kot računalnik simulacijska stroja, katerih namen je iz trenutno znanih podatkov čim bolje predvideti trenutne in prihodnje dogodke ter se optimalno odzvati nanje.

CŽS	računalnik
senzorna funkcija	vid, sluh, vonj, okus, otip, temperatura, bolečina, miška, tipkovnica, kamera, mikrofon, pritisk
spominska funkcija	možganska skorja, bazalni gangliji, hrbtenjača
integrativna funkcija	možganska skorja, bazalni gangliji, hrbtenjača
efektorska funkcija	skeletne mišice, gladke mišice, žleze
	trdi disk, USB ključ, delovni pomnilnik, DVD, CD
	programska oprema, centralni in grafični procesor, jedro operacijskega sistema
	zaslon, projektor, tiskalnik, zvočnik, računačniško nadzorovane naprave

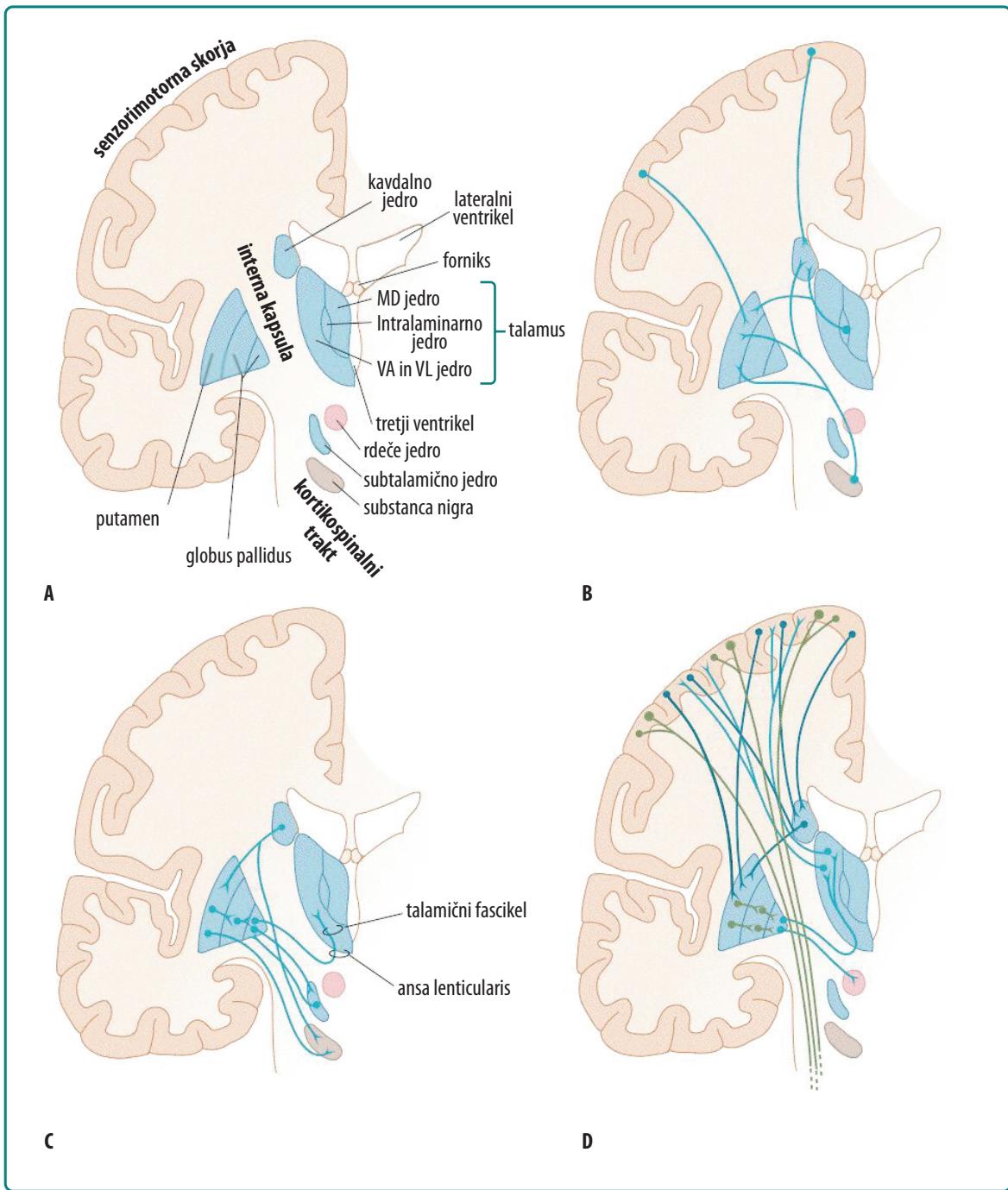
3. Bazalni gangliji

Bazalni gangliji so subkortikalna jedra, ki se nahajajo globoko v sredini velikih možganov. Anatomsko so del velikih možganov, diencefalona in mezencefalona. Funkcionalno jih delimo na skletomotorna, okulomotorna, asociativna in limbična jedra. Zaradi širokega spektra kortikalnih funkcij, ki jih koordinirajo jedra bazalnih ganglijev, jim je v nevroznosti posvečeno veliko pozornosti. Napake v delovanju bazalnih ganglijev in posledično koordinaciji kortikalnih centrov se kažejo kot nezmožnost opravljanja najbolj osnovnih človeških aktivnosti, kot je na primer hoja. Diplomska naloga se osredotoča na učinkovino, ki jo uporabljamo v zdravljenju Parkinsonove bolezni, zato se bomo v nadaljevanju omejili na vlogo bazalnih ganglijev v koordinaciji hotenega gibanja [3].

Bazalni gangliji skupaj s talamusom tvorijo mrežo nevronov, ki sprejema in obdeluje informacije iz motoričnega korteksa. Sodelujejo pri selekciji stimulusov in tvorbi spomina, ki omogoča samodejno ponavljanje določenih gibov. Nevroni bazalnih ganglijev nato projicirajo nazaj v motorični korteks, ki poskrbi za krčenje ustreznih mišic. Primer delovanja bazalnih ganglijev je vožnja s kolesom. Danes se nam vožnja ne zdi nič posebnega, a brez predhodne vadbe nezavestni centri ne znajo izvajati ponavljačega gibanja, ki je potrebno za vzdrževanje ravnotežja na kolesu.

Striatum je glavno področje sprejema informacij v bazalne ganglike. Vanj se stekajo projekcije iz motoričnega korteksa, zlasti senzorimotorne in anterirorne premotorne skorje. Kortikostriatne projekcije so ekscitatorne, katerih glavni prenašalec je glutamat. Poleg teh vlaken v striatum projicirajo tudi intralaminarna talamična jedra, substantia nigra, amigdala, hipokampus in jedra rafe [4].

Veliko večino živčnih celic striatuma sestavljajo srednje veliki nevroni, ki imajo za prenašalec gama-aminobutirno kislino (GABA), v manjšem deležu pa so prisotni tudi holinergični internevroni. Aktivnost GABA nevronov uravnavajo glutamat, dopamin in acetilholin. Glutamat se sprošča iz kortikostriatnih nevronov, dopamin iz nigrostriatnih, acetilholin pa iz holinergičnih internevronov. Vsi prenašalci delujejo ekscitatorno na GABA nevrone, kar pomeni, da s stimulacijo povečanega izločanja GABA povzročajo inhibicijo jeder, v katera ti nevroni projicirajo. Izjema so tisti GABA nevroni, ki izražajo D₂ receptorje. Aktivacija teh receptorjev zmanjša pogostost proženja GABA nevronov in tem aktivira področja, v katera projicirajo [3].



Slika 3 - Anatomijski diagrami različnih povezav bazalnih ganglijev v človeškem mozgu. Prirejeno po [4].

A) Anatomijski diagram bazalnih ganglijev v prečnem rezu. MD - mediodorsalno, VA - ventroanteriorno, VL - ventrolateralno jedro talamus. **B)** Aferentne projekcije v bazalne ganglike. **C)** Povezave med jedri bazalnih ganglijev. **D)** Eferentne projekcije iz bazalnih ganglijev.

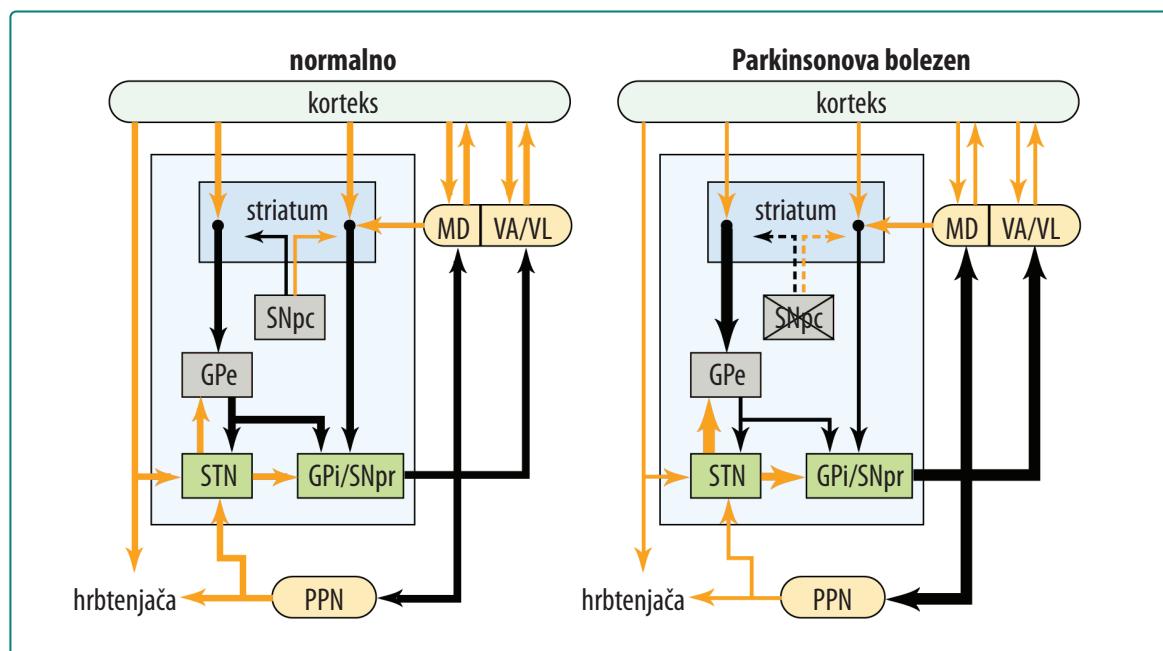
3.1. Direktna pot

Striatum je t.i. relejno jedro, kjer se preklaplajo nevroni direktne in indirektni poti. Direktna pot vključuje približno polovico striatnih nevronov. Ti projicirajo v notranji globus pallidus (GPi) in substanco nigro pars reticulato (SNpr), od tam pa preko talamus nazaj v korteks. Posebnost GABA striatnih nevronov direktni poti je, da izražajo dopaminske receptorje D₁ in kot kotransmitem izločajo substanco P in dinorfin [3, 4].

3.2. Indirektna pot

Indirektna pot je dobila svoje ime zaradi dodatne obdelave informacij, preden gredo iz striatuma nazaj v korteks. Ta pot vključuje drugo polovico striatnih nevronov, ki, za razliko od nevronov direktni poti, izražajo receptorje D₂ in poleg GABA izločajo enkefaline. Projekcije gredo iz striatuma v zunanji globus pallidus (GPe) in od tam v subtalamično jedro (STN). Iz subtalamičnega jedra gredo nevroni v GPi in SNpr, nato v talamus in končno v motorični korteks. Posebnost te poti sta torej obdelava v GPe in STN, sicer pa je večji del skupen z direktno potjo.

Striatni GABA nevroni direktni poti so preko receptorjev D₁ pod močnim ekscitatornim vplivom dopamina, medtem ko so nevroni indirektni poti preko receptorjev D₂ pod inhibitornim vplivom [3, 4].



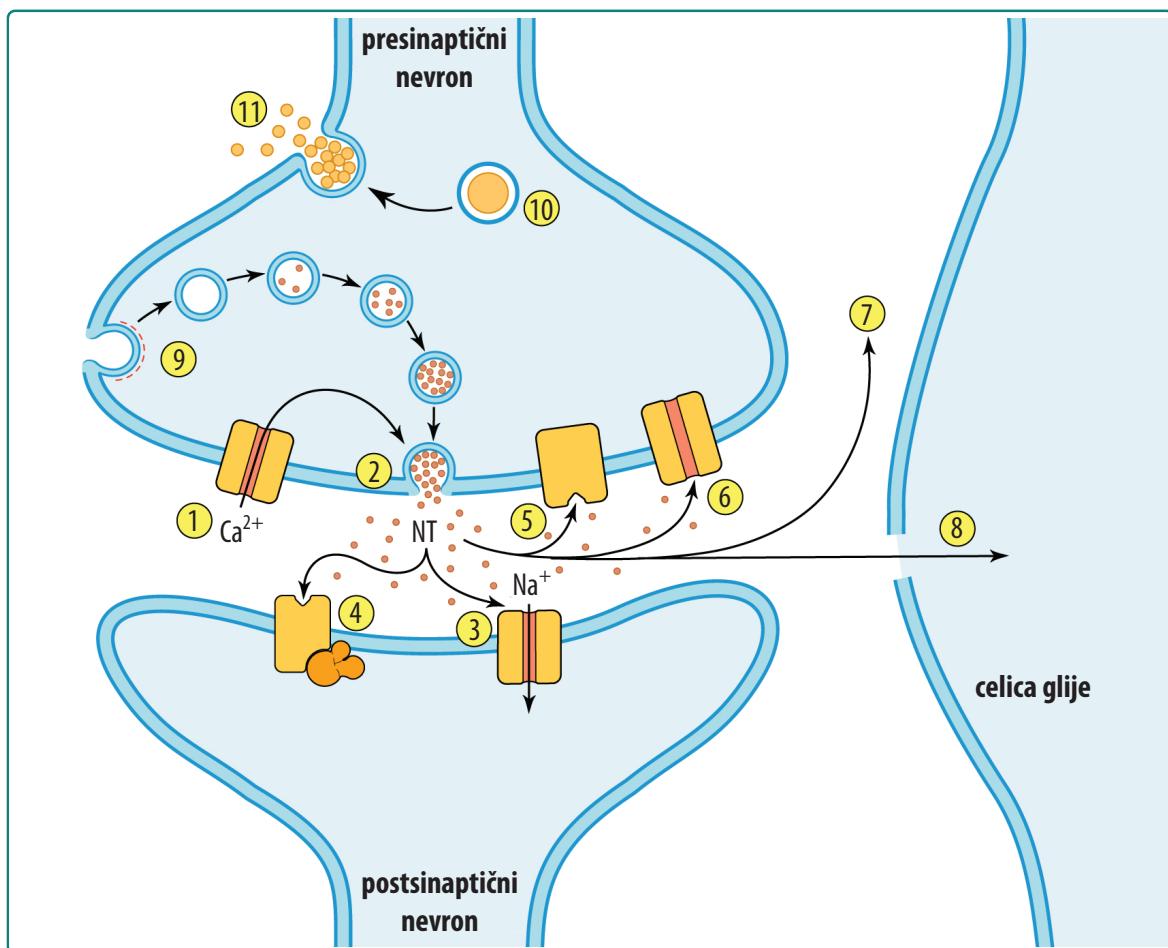
Slika 4 - Diagram patologije Parkinsonove bolezni. Prirejeno po [3].

Za Parkinsonovo bolezni je značilno, da zaradi nezadostne dopaminergične stimulacije striatuma pride do nezadostne ali prevelike stimulacije jader, ki jih oživčujejo striatni GABA-ergični nevroni.

Oranžne puščice predstavljajo glutamatergične poti, črne pa GABA-ergične. Debelina puščic odgovarja aktivnosti nevronov. SNpc (Substanca nigra pars compacta), GPe (globus pallidus externus), STN (subtalamično jedro), GPI (globus pallidus internus), SNpr (Substanca nigra pars reticulata), MD (mediodorsalno jedro talamus), VA/VL (ventroanteriorno jedro / ventrolateralno jedro talamus), PPN (pedunkulopontinsko jedro)

4. Nevrotransmisijska komunikacija

V devetnajstem stoletju je prevladovalo prepričanje, da so živčni centri kontinuirano povezani senzorični in motorični nevroni. Na začetku dvajsetega stoletja je Cajal odkril, da živčno omrežje sestavlja diskretne enote - nevroni [5]. Po tem odkritju so začeli raziskovati, na kakšen način nevroni komunicirajo med seboj. Pojavili sta se dve teoriji. Prva je zagovarjala električni prenos na podoben način, kot je bilo znano za prenos informacije po nevronu. Druga teorija je zagovarjala kemični prenos informacije, kot ga poznamo danes. Na podlagi številnih dokazov se je slednja uveljavila kot pravilna na začetku petdesetih let prejšnjega stoletja, ko je kemični prenos spremenil tudi glavni zagovornik teorije električnega prenosa [6].

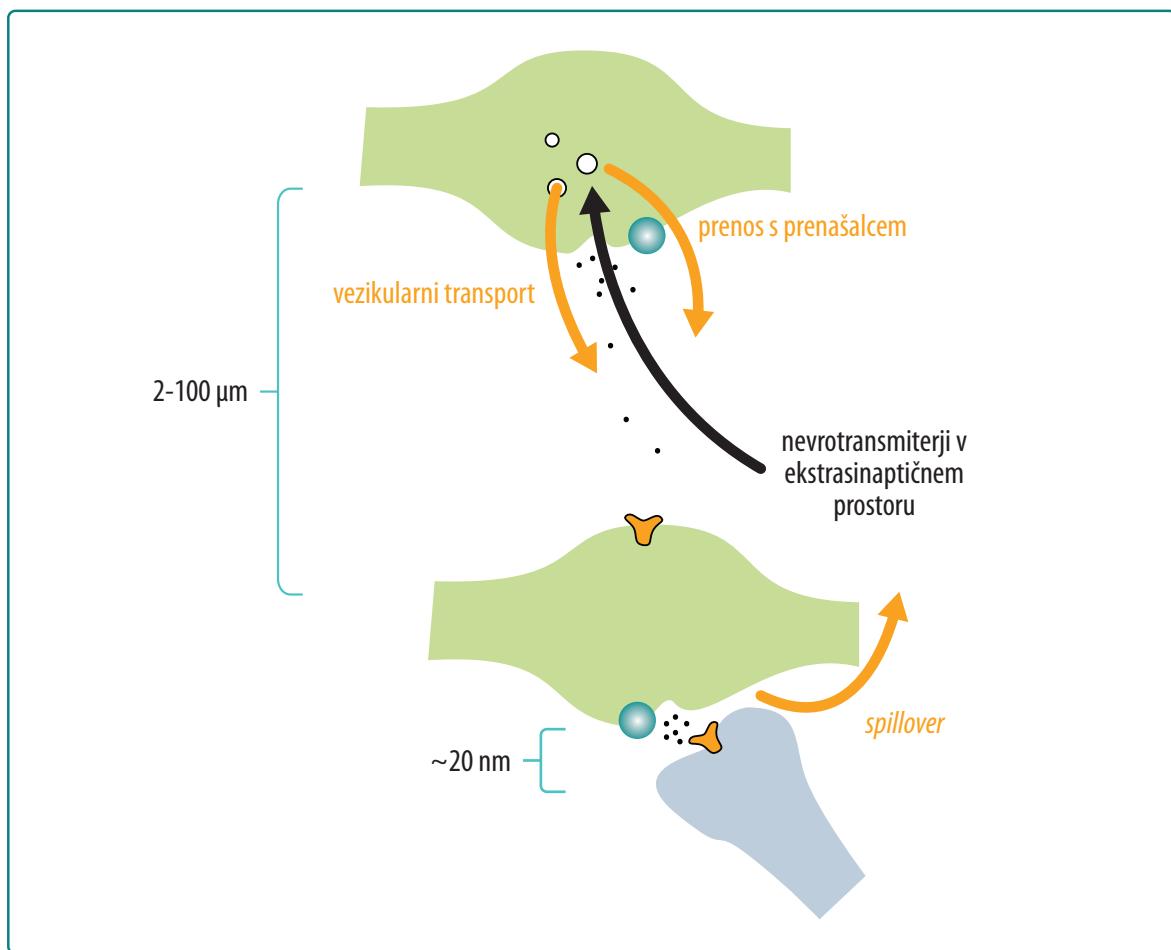


Slika 5 - Aktivnosti v sinapsi. Prikazuje dejavnosti v presinaptični in postsinaptični neuroni.

Depolarizacija sproži odprtje napetostno odvisnih Ca^{2+} kanalčkov (1). Kalcijevi ioni se vežejo s sekretornimi vezikli ob membrani, ki se nato izlijejo v sinaptično špranje (2). Po izljetju neurotransmiterja (NT) se ta lahko veže na postsinaptični ionofor (3) ali na protein G sklopljen receptor (4). Neurotransmitter se lahko veže tudi na receptor presinaptičnega neurona in s tem olajša ali oteži nastanek novega akcijskega potenciala (5). Učinek neurotransmiterja se lahko prekine s privzemom v presinaptični neuron (6), difuzijo iz sinaptične špranje (7) ali privzemom v celice glije (8). Sinaptični veziki se reciklirajo z endocitozo (9). Slike (10) in (11) prikazujeta izliv neuropeptidov.

4.1. Sinaptični prenos

Sinaptični prenos poteka po določenem kronološkem zaporedju. Akcijski potencial sproži odprtje napetostno odvisnih Ca^{2+} kanalov. Vtok kalcija v presinaptični nevron sproži fuzijo veziklov z membrano presinaptičnega nevrona in izlitje nevrotransmiterja v sinaptično špranjo. Nevrotransmiter se nato z difuzijo prenese do receptorja na postinaptičnem nevronu. Hitro in počasno sinaptično transmisijo ločimo na podlagi receptorja na postsinaptičnem nevronu. O hitri sinaptični transmisiji govorimo takrat, kadar so receptorji na postsinaptičnem nevronu ionski kanali - ionofori. Aktivnost teh receptorjev se meri v milisekundah, medtem ko receptorji, sklopljeni s proteinom G, za svoje delovanje potrebujejo nekaj sekund. Zaradi bistveno daljšega časa od vezave liganda do učinka ta način prenosa imenujemo počasni sinaptični prenos [6, 7].



Slika 6 - Primer zunajsinaptičnega prenosa. Prirejeno po [6].

Izlitje vezikla z nevrotransmitem povzroči porast koncentracije v sinaptični špranji na 1 do 10 mM. Če upoštevamo, da učinkovine običajno dosežejo 0,05 do 5 mM koncentracijo, potem postane jasno, da morajo za sinaptične receptorje tekmovati z endogenimi prenašalci. Zaradi tega je zelo verjetno, da se učinkovine v veliki meri vežejo ekstrasinaptično.

4.2. Ekstrasinaptični prenos

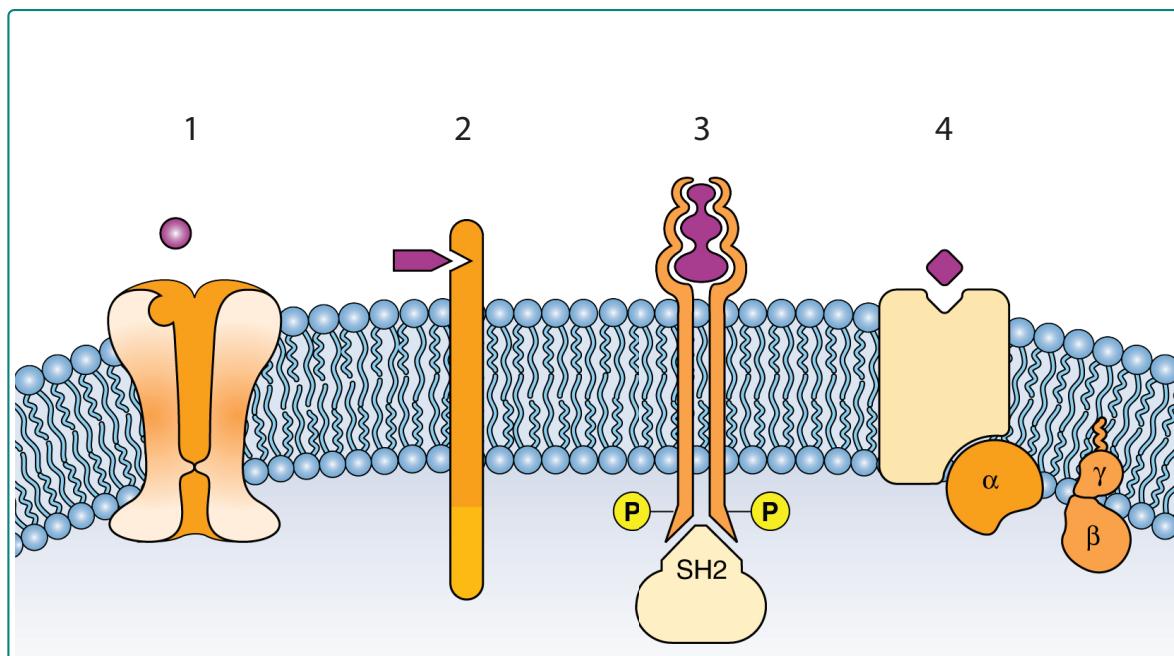
Precejšen delež prenosa informacij v CŽS je ekstrasinaptičen. Pri tem načinu nevrotransmiter prepotuje bistveno daljšo razdaljo od presinaptičnega nevrona do svoje nesinaptične tarče na drugem nevronu. Pri ekstrasinaptičnem prenosu gre za dva mehanizma. Prvi je izločanje nevrotransmiterja iz zadebelitev vzdolž aksona, drugi pa difuzija prenašalca iz sinaptične špranje do bližnjih nevronov (*spillover*). S tem lahko proženje določenega nevrona vpliva tudi na tiste nevrone, ki z njim niso sinaptično povezani. Skupina bližnjih nevronov lahko na takšen način ustvari bazalni nevrotransmiterski medij, ki vpliva na celotno skupino. Z izračuni koncentracij nevrotransmiterja v sinaptični špranji so pokazali, da imajo eksogene učinkovine ob konstantnem proženju nevrona relativno malo možnosti za delovanje direktno v sinapsi, veliko večjo možnost pa na ekstrasinaptičnih receptorjih, kar je izjemnega pomena za razumevanje delovanja zdravil [6].

4.3. Transmembranski receptorji

Receptorje ločimo na podlagi efektorskega sistema, s katerim so povezani. Prvo skupino predstavljajo receptorski ionofori oz. ionski kanali. Imajo pet transmembranskih domen, v sredini kanala pa zanko, ki ima funkcijo vrat. Po vezavi agonista receptor spremeni konformacijo, vrata se odprejo in ioni lahko preidejo skozi poro. Kateri ioni lahko prehajajo skozi kanal je odvisno od receptorja, saj so ionsko specifični. Spremembe v koncentracijah ionov v nevronu lahko povzročijo hiperpolarizacijo ali depolarizacijo. Ob vezavi agonista na GABA_A ali glicinske receptorje pride do vtoka negativnih ionov (Cl⁻) v nevron in s tem do hiperpolarizacije, kar zmanjša verjetnost za nastanek akcijskega potenciala. Nasprotno vtok pozitivnih ionov (Na⁺, K⁺) nevron depolarizira in poveča verjetnost za nastanek akcijskega potenciala. Odzivi receptorskih ionoforov so izjemno hitri, saj za delovanje ne potrebujejo sinteze sekundarnih prenašalcev niti fosforilacij encimov.

V drugo skupino spadajo receptorji, ki imajo intrinzično gvanilil-ciklazno aktivnost in po aktivaciji sintetizirajo ciklični gvanozin-monofosfat. Receptorji z intrinzično gvanilil-ciklazno aktivnostjo so običajno izdatno fosforilirani in se ob vezavi liganda hitro defosforilirajo. To povzroči konformacijsko spremembo in aktivacijo gvanilil-ciklazne domene. Od citoplazemske gvanilil-ciklaze se loči po tem, da za delovanje ne potrebuje kalcijevih ionov.

V tretjo skupino prištevamo receptorje, ki imajo intrinzično tirozin-kinazno aktivnost. Primer takih receptorjev je receptor za epidermalni rastni faktor, trombocitni rastni faktor in inzulin. Udeleženi so v regulaciji celične rasti in diferenciacije. Aktivacija receptorja poteka tako, da po vezavi liganda pride do dimerizacije dveh receptorjev in intermolekularne avtofosforilacije tirozinskih ostankov v in na kinazni domeni. Avtofosforilacija sproži aktivnost katalitične domene in fosforilacijo drugih encimov. To sproži kaskado reakcij, katerih končni rezultat je fosforilacija jedrnih proteinov in regulacija transkripcije genov.



Slika 7 - Tipi transmembranskih receptorjev glede na efektorski sistem. Prirejeno po [8].

1) receptorSKI ionofor ali ionski kanalček - *ligand-gated ion channel*, 2) receptor z intrinzično gvanilil ciklazno aktivnostjo, 3) receptor z intrinzično tirozin kinazno aktivnostjo, 4) s proteinom G sklopljen receptor - *GPCR*

Četrta skupina so s proteinom G sklopljeni receptorji (GPCR). Ti imajo bistveno širši spekter funkcij kot prej opisani receptorji, zato ne preseneča, da je največ znanih receptorjev vezanih na ta efektorski mehanizem. Značilno za vse GPCR je, da ima sedem transmembranskih domen, na katere so s citosolne strani vezane podenote alfa, beta in gama. Nekateri GPCR, kot na primer GABA_B, α₂, D₂ in M₂, regulirajo prehodnost membrane za K⁺ ione neodvisno od sekundarnega prenašalca. To poteka tako, da ena izmed podenot oddifundira do ionskega kanala in direktno vpliva na prehodnost za ione. Druga skupina je povezana z modulacijo aktivnosti adenilat ciklaze, ki sintetizira sekundarni prenašalec cAMP (ciklični adenzin monofosfat). Vezava agonista na receptor lahko sproži aktivacijo adenilat-ciklaze, kot v primeru β₂ adrenoreceptorja, ali pa

inhibicijo, kot v primeru aktivacije receptorja α_2 . Spremembe v koncentraciji cAMP regulirajo aktivnost protein-kinaze A, ki s fosforilacijo uravnava aktivnost drugih encimov. Tretja skupina GPCR je povezana z aktivacijo fosfolipaze C in posledičnim povišanjem intracelularnega inozitol trifosfata (IP_3) ter diacilglicerola (DAG). IP_3 in DAG igrata vlogo v intracelularni homeostazi Ca^{2+} in fosforilaciji encimov prek vpliva na protein kinazo C, fosfolipazo A₂ in fosfolipazo D [8].

Preglednica II - Nevrotransmiterji v bazalnih ganglijih in njihovi učinki. Prikejeno po [4].

transmiter	receptor	sekundarni prenašalec	učinek
acetilholin	N (nikotinski)	-	ekscitator, odprtje Na^+ kanalov
	M (muskarinski)	cAMP ali IP_3 , DAG	ekscitator ali inhibitoren, odprtje ali zaprtje Ca^{2+} kanalov
glutamat	NMDA (N-metil-D-aspartat)	-	zaznava simultano aktivnost sinaps, lahko sproži spremembe v strukturi sinapse, odprtje Ca^{2+} kanalov ob depolarizaciji
	kainat	-	ekscitator
	AMPA (amino-metil-propionska kislina)	-	ekscitator, odprtje Na^+ kanale
	metabotropni receptor	IP_3 , DAG	ekscitator, povišanje intracelularnega Ca^{2+}
dopamin	D ₁	cAMP	ekscitator, povišanje cAMP
	D ₂ (postsinaptični)	cAMP	inhibitoren, znižanje cAMP
GABA	GABA _A (presinaptični)	-	inhibitoren, odprtje Cl^- kanalov
	GABA _B (postsinaptični)	IP_3 , DAG	inhibitoren, zaprtje Ca^{2+} kanalov, odprtje K^+ kanalov
glicin	-	-	Inhibitoren, odprtje Cl^- kanalov

4.4. Nevrotransmiterji

Nevrotransmiterji so endogene substance, ki so odgovorne za kemijski prenos informacije med nevroni. Kriteriji, ki jim mora ustrezati substanca, da je definirana kot nevrotransmiter, se od avtorja do avtorja nekoliko razlikujejo, bistveni pa so naslednji:

- ➡ Nevrotransmiter mora nastajati v nevronu, iz katerega se sprošča.
- ➡ Nevrotransmiter mora biti prisoten v nevronu in njegovih presinaptičnih končičih.
- ➡ Nevrotransmiter se mora ob električni aktivnosti nevrona sproščati iz njegovih presinaptičnih končičev.
- ➡ Eksogeno dodan prenašalec mora na postsinaptičnem nevronu sprožiti enak odziv kot stimulacija presinaptičnega nevrona.
- ➡ Nevrotransmiter ne prehaja prek krvnomožganske bariere.

Nevrotransmiterje ločujemo tudi na podlagi njihove molekulske mase. Nizkomolekularni transmiterji so aminokisline (glicin, glutamat, aspartat, GABA), biogeni amini (noradrenalin, adrenalin, dopamin, serotonin, histamin), acetilholin, nukleozidi (adenozin) in plini (NO). Visokomolekularni oz. peptidni nevrotransmiterji spadajo v drugo skupino. Tipični predstavniki te skupine so prenašalci v opioidnem sistemu (enkefalini, dinorfin, substanca P) [9].

4.4.1.Sinteza

Nevrotransmiterji se sintetizirajo v nevronih iz snovi, ki so sposobne prehoda hematoencefalne bariere. Običajno so prekurzorji prenašalcev aminokisline, ki imajo specifične transporterje in se lahko prenesejo preko bariere. To lastnost izkoriščamo pri zdravljenju Parkinsonove bolezni z levodopo. Nizkomolekularni nevrotransmiterji se sintetizirajo v citoplazmi živčnih končičev, nato pa jih vezikularni transporterji prenesejo v sekretorne vezikle. Visokomolekularni nevrotransmiterji se zaradi peptidne strukture sintetizirajo v telesu nevrona in z aksonskim transportom prenesejo do živčnih končičev [7].

4.4.2.Skladiščenje

Vežiki imajo na svoji površini transporterje, ki sintetizirane nevrotransmiterje aktivno prenašajo iz citoplazme v lumen vezikla. S tem jih zaščitijo pred degradacijo s citoplazemskimi encimi in zagotovijo zadostno koncentracijo v veziklu. Transporterji so sposobni črpati proti izjemnemu koncentracijskemu gradientu in v lumnu vezikla vzpostaviti tudi do 100 mM koncentracijo. Znani so transporterji za več malih nevrotransmiterjev, npr. vezikularni monoaminski transporter 2 (VMAT2) za monoamine v CŽS, transport pa je v večini primerov odvisen od koncentracijskega gradiента H⁺ ionov. Za monoamine in acetilholin je znano, da poteka zamenjava dveh protonov za en nevrotransmiter. Učinkovine, ki delujejo na vezikularne transporterje, imajo izrazite vedenjske učinke, ker povečajo količino dopamina, noradrenalina in serotonina v sinapsah. Najbolj znan inhibitor vezikularnega transporta je rezerpin, ki z inhibicijo VMAT2 prepreči skladiščenje monoaminov. Rezerpin najprej povzroči prehoden porast koncentracij monoaminov, nato pa prevlada razgradnja v citosolu. To ima za posledico padec vezikularnih koncentracij monoaminergičnih prenašalcev, kar izrazito poslabša monoaminergični prenos in pri nekaterih povzroči razvoj depresije. Druge učinkovine, ki vplivajo na skladiščenje monoaminov v vezikle, so amfetamini. Ti delujejo tako, da se s pomočjo prenašalca za monoamine skladiščijo v vezikle namesto monoaminskih nevrotransmiterjev. Posledica je povišana koncentracija monoaminov v živčnih končičih, kar povzroči delovanje membranskih transporterjev v obratni smeri in aktivno črpanje monoaminov v sinapso. Rezultat je povišana koncentracija noradrenalina in dopamina v sinapsah in s tem povezane motnje vedenja in razpoloženja [7].

4.4.3.Sproščanje

Vežiki z nevrotransmiterjem se z Rab proteini vežejo na membrano presinaptičnega nevrona. Ob depolarizaciji membrane živčnega končiča se odprejo napetostno odvisni

kalcijevi kanali, kar sproži hitro povišanje lokalne koncentracije kalcija. Ca^{2+} ioni se vežejo na Rab proteine, ki sprožijo fuzijo vezikla z membrano presinaptičnega nevrona in izlitje nevrotransmiterja v sinaptično špranjo. Nastanek akcijskega potenciala in izlitje nevrotransmiterja je močno odvisno od inhibitornih in ekscitatornih stimulusov povezanih nevronov in od predhodne aktivnosti nevrona [6, 7].

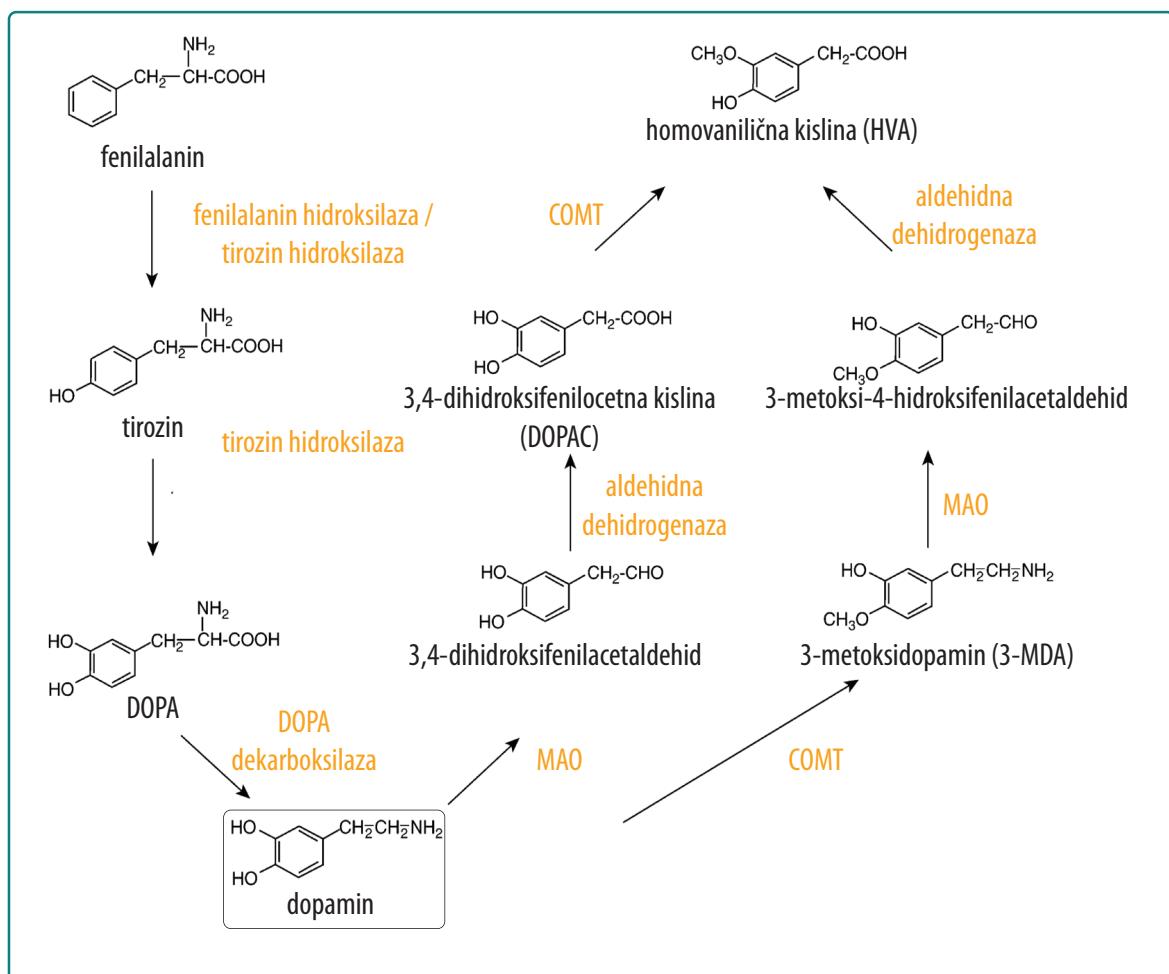
4.4.4. Inaktivacija

Prekinitve delovanja nevrotransmiterjev se lahko zgodi na več načinov. Nevrotransmiterji se lahko v zunajcelični tekočini metabolizirajo v neaktivne produkte (acetilholin), privzamejo v sosednje celice (ostali nevrotransmiterji) ali oddifundirajo iz sinaptične špranje. Monoamini in GABA se privzemajo z Na^+ in Cl^- kotransportom, medtem ko se glutamat prenaša s Na^+ in H^+ kontransportom in K^+ antiportom. Nevrotransmiterji se lahko ponovno privzamejo v presinaptični nevron, privzamejo v postsinaptični nevron ali v sosednje celice glije. Monoamini se, z izjemo histamina, prenesejo večinoma v presinaptični nevron, kjer se reciklirajo, medtem ko se GABA in glutamat privzemata v celice glije [7].

5. Vloga dopamina v CŽS

5.1. Sinteza in skladiščenje

Primarni prekurzor sinteze dopamina je tirozin, ki ga specifični transporter aktivno prenaša preko hematoencefalne bariere. Po privzemu v končiče dopaminergičnih nevronov tirozin-hidroksilaza (TH) pretvori tirozin v dihidroksifenilalanin (L-DOPA). Tirozin hidroksilaza je prisotna v vseh nevronih, ki sintetizirajo kateholamine in katalizira adicijo hidroksilne skupine na meta pozicijo tirozina. Primarna substrata TH sta tirozin in molekularni kisik, kot kofaktor pa potrebuje Fe^{2+} in biopterin. V skrajnih primerih je prekurzor za sintezo dopamina lahko tudi fenilalanin, saj je TH sposobna tudi hidroksilacije fenilalanina v tirozin. TH je zaradi nizke K_m in relativno visokih fizioloških koncentracij tirozina skoraj vedno nasičena in deluje z maksimalno hitrostjo. Hitrost delovanja encima je po potrebi uravnana s koncentracijo bioptera, ki deluje kot donor vodika in je nujen za delovanje. Analogi tirozina, kot je alfa-metiltirozin, so kompetitivni inhibitorji tirozin-hidroksilaze in znižajo nivo kateholaminov v CŽS.



Slika 8 - Sintezne in razgradnje poti dopamina. Prirejeno po [11].

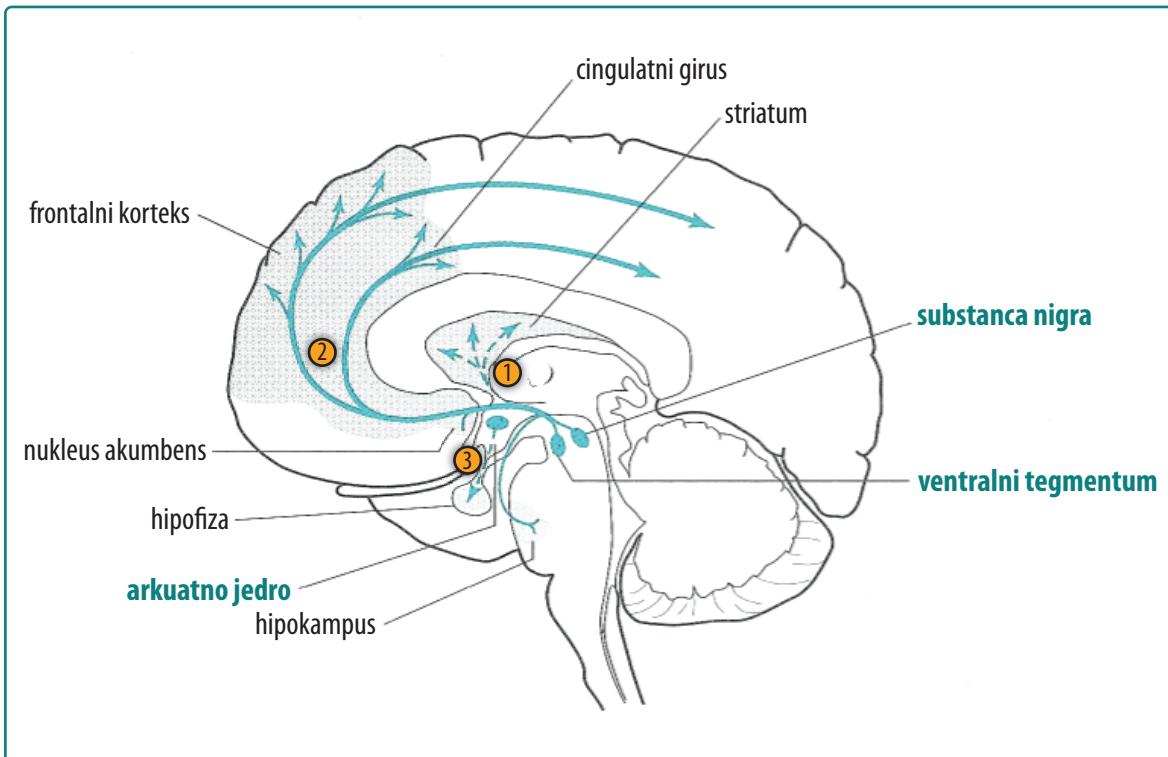
Naslednji encim v kaskadi je DOPA-dekarboksilaza (DDC). DDC je encim, ki katalizira dekarboksilacijo levodope v dopamin in ima kot kofaktor vezan piridoksal fosfat. Za levodope ima DDC nizko K_m in visoko V_{max} , zato se hitro presnavlja v dopamin. Poleg levodope ima DDC za substrat še 5-hidroksitriptofan in druge aminokisline, zato jo imenujejo tudi dekarboksilaza aromatskih aminokislin (AADC). Prisotna je v kateholamergičnih in serotonergičnih nevronih ter nekaterih drugih tkivih, na primer v ledvicah in žilah. V dopaminergičnih nevronih katalizira končno stopnjo pretvorbe tirozina v dopamin, kar izkoriščamo pri terapiji Parkinsonove bolezni. Z jemanjem levodope se namreč poveča koncentracija dopamina v dopaminergičnih nevronih in s tem izboljša od dopamina odvisen prenos [10, 11].

5.2. Dopaminergične poti v CŽS

V CŽS se nahajajo tri primarna dopaminergična jedra, in sicer: substantia nigra, arkuatno jedro in ventralni tegmentum, izmed katerih vsako projicira v specifičen del možganov.

Nigrostriatno dopaminergično pot sestavlja telesa nevronov v substanci nigri, ki projicirajo v putamen in kavdalno jedro (neostriatum). Ta povezava regulira motorično kontrolo in motorične navade, zato pri odmiranju nigrostriatnih nevronov, kar je značilnost Parkinsonove bolezni, pride do izrazitega poslabšanja v motoriki hotenih gibov. Padec dopaminergičnega prenosa v tem sistemu izboljšujemo z dodajanjem levodope, ki zvišuje nivo dopamina. Težava pri zdravljenju z levodopo je, da povišan nivo dopamina ni omejen le na nigrostriatni sistem in lahko zato pride do neželenih ali celo toksičnih učinkov, kot so prividi in stanja, podobna amfetaminskim psihozam.

Druga pot je znana kot mezolimbokortikalna dopaminergična pot. Sestavlja jo nevroni ventralnega tegmentuma, ki projicirajo v limbični sistem, prefrontalni korteks in cingulatni girus. Ta povezava je odgovorna za kognitivne in čustvene aspekte dopaminergičnega prenosa. Najbolj raziskana je vloga tega sistema pri razvoju odvisnosti od drog, saj mezolimbična povezava utrjuje užitek in nagrado ob njihovem uživanju. Drugi aspekt mezolimbokortikalne poti je vloga v psihotičnih in shizofrenih stanjih, zato antagoniste D_2 dopaminergičnega prenosa uporabljam za zmanjšanje pojava halucinacij. Podobno kot velja za levodopo, tudi antagonisti D_2 receptorjev (nevroleptiki) niso omejeni le na učinkovanje na ta sistem in imajo zato številne neželene učinke. Inhibicija D_2 receptorjev nigrostriatnega sistema namreč lahko povzroči Parkinsonovi bolezni podobne simptome, kot so parkinsonizem, sekundarni parkinsonizem in ekstrapiramidalne motnje.



Slika 9 - Dopaminergične poti v centralnem živčnem sistemu. Pritejeno po [10].

1) nigrostriatalna pot poteka od substance nigre do striatuma, 2) mezolimbokortikalna pot - od ventralnega tegmentuma v kortex, 3) tuberoinfundibularna pot - od arkuatnega jedra do hipofize

Tretja pot gre iz arkuatnega jedra do hipofize in je znana kot tuberoinfundibularna pot. Ta povezava uravnava sintezo prolaktina v hipofizi. Sproščeni dopamin iz končičev tuberoinfundibularnih nevronov se veže na hipofizne D₂ receptorje, s tem se zmanjša aktivnost adenilat ciklaze, posledično pade koncentracija cAMP, kar zavre sintezo prolaktina. Znano je, da antagonisti D₂ receptorjev lahko povzročijo hiperprolaktinemijo in s tem laktacijo, zato se agonisti D₂ receptorjev, kot je bromokriptin, uporabljajo za zdravljenje hiperprolaktinemije in farmakološko prekinitev laktacije [10].

5.3. Inaktivacija dopamina

Učinek dopamina se prekine tako, da dopamin oddifundira iz sinapse ali se privzame v pre- ali postsinaptični nevron.

5.3.1. Ponovni privzem

Velika večina dopamina, ki se sprošča v striatumu se inaktivira tako, da se ponovno privzame v presinaptični nevron, nekaj pa se ga privzame v sosednje celice glije in postsinaptični nevron. Privzem omogoča hiter padec koncentracije dopamina v sinapsi in s tem prekinitev učinka, omejitev difuzije v ekstrasinaptični prostor in recikliranje nevrotransmiterja.

Dopamin se privzema preko specifičnega dopaminskega transporterja (DAT). V delih korteksa, kjer DAT ni prisoten, se dopamin privzema preko transporterja za noradrenalin (NET). DAT je transmembranski protein z dvanajstimi transmembranskimi domenami in petimi možnimi fosforilacijskimi mesti, ki omogočajo regulacijo aktivnosti. Pomen dopaminskega transporterja za vzdrževanje prave koncentracije dopamina se kaže v tem, da miši, ki imajo odstranjen gen za DAT, izkazujejo izrazito motorično hiperaktivnost, kar je značilno za stanja, pri katerih je povišan nivo dopamina. Tako stanje pri človeku lahko izzovemo z inhibitorji dopaminskega transporterja, izmed katerih je najbolj znan kokain.

Znane so tudi učinkovine, ki povzročijo delovanje DAT v obratni smeri. To so amfetamini in sorodne substance. Delujejo tako, da z vezavo na DAT povzročijo njegovo konformacijsko spremembo, kar spremeni smer črpanja dopamina. Poleg tega se amfetamini s pomočjo VMAT2 pakirajo v vezikle in izpodrivajo dopamin, kar poveča njegov koncentracijski gradient in še dodatno pospeši aktivno črpanje dopamina iz presinaptičnega končiča.

Delovanje DAT je vezano na koncentracijski gradient Na^+ in Cl^- ionov. To so dokazali z inhibicijo Na-K-ATPaze, kar je prekinilo privzem. Inhibicija privzema v odvisnosti od Na^+ gradiента je najbrž fiziološko pomembna, saj je med izlitem dopamina njegov privzem kratkotrajno inhibiran [10, 11].

5.3.2. Metabolizem

Po privzemu se lahko dopamin encimsko razgradi, za kar sta odgovorna dva encima, in sicer katehol O-metil transferaza (COMT) in monoamin-oksidaza (MAO).

Katehol O-metil transferaza

COMT je encim, ki se nahaja na citosolni strani membrane postsinaptičnih nevronov in metilira meta-hidroksi skupino dopamina. Za svoje delovanje potrebuje S-adenozil metionin, ki je donor metilne skupine. Je relativno nespecifičen encim, saj lahko metilira meta hidroksi skupino vseh endogenih kateholaminov (adrenalin, noradrenalin, dopamin). Zaradi znatnega prispevka k metabolizmu dopamina tako na periferiji kot v centralnem živčnem sistemu se sočasno z levodopo pogosto jemlje tudi inhibitorje COMT (tolkapon, entakapon). Inhibicija perifernega encima poveča biološko uporabnost levodope v centralnem živčnem sistemu, medtem ko inhibicija centralne COMT (tolkapon) prepreči encimsko razgradnjo v nevronih. Smisel jemanja inhibitorjev COMT je znižanje potrebne doze levodope in s tem zmanjšanje pojava neželenih učinkov [10].

Monoamin-oksidaza

MAO je flavoencim, ki se nahaja na zunanji mitohondrijski membrani živčnih končičev presinaptičnega nevrona. Katalizira reakcijo oksidativnega deaminiranja kateholaminov in s tem zmanjša njihovo koncentracijo. Po do sedaj znanih podatkih encim ni prisoten v sinapsi, je pa prisoten v celicah glije, ki obdajajo sinapse. Po privzemu dopamina v presinaptični nevron ali celico glije s pomočjo DAT je dopamin podvržen razgradnji z MAO [10, 12].

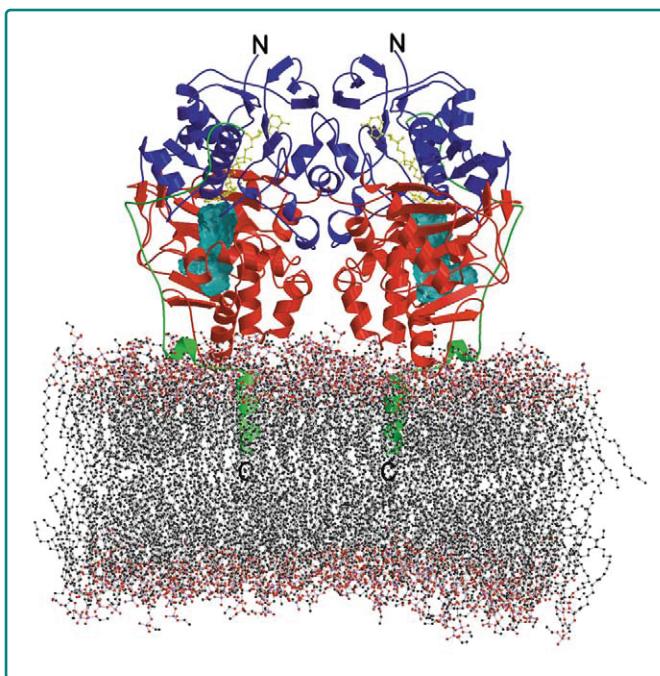
MAO se v tkivih pojavlja v dveh izoblikah, in sicer MAO-A in MAO-B. Izoeencima se razlikujeta po substratni in inhibitorski specifičnosti, tkivni in celični distribuciji, imunoloških lastnostih in aminokislinskih zaporedjih [10, 12].

Preglednica III - Primerjava med izoblikama MAO.

* Dopamin je substrat tudi za MAO-A, vendar se pri človeku zaradi različne tkivne distribucije presnavlja v veliki večini z MAO-B.

	MAO-A	MAO-B
fiziološki substrati	adrenalin, noradrenalin, serotonin	feniletilamin, dopamin*
specifični inhibitorji	klorgilin	pargilin, selegilin, rasagilin
prisotnost izven CŽS	gastrointestinalni trakt, jetra, placentna	trombociti
aktivno mesto	okrogle oblike, ena votlina velika $\sim 550 \text{ \AA}^3$	bolj ploščate oblike, substratna (290 \AA^3) in vstopna votlina (390 \AA^3)
klinična uporaba inhibitorjev	depresija	Parkinsonova bolezen

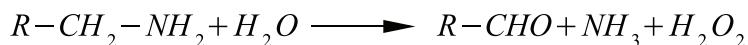
6. Lastnosti humane MAO



Slika 10 - Dimer MAO-B v zunanji mitohodrijski membrani [21].

Humano monoamin-oksidazo je prvi odkril Hare [13]. Opazil je, da v ekstraktu jeter pride do degradacije tiramina, zato je encim sprva poimenoval tiramin-oksidazu. Kasneje so ugotovili, da je encim sposoben katalizirati oksidativnega deaminiranja več drugih aminov, zato so ga preimenovali v monoamin-oksidazo. Kljub vsemu tudi to ime ni popolnoma točno, saj so MAO substrati lahko tudi dolgorižni diamini (dekametylendiamin) [14].

MAO katalizira oksidacijo amina v imin, pri čemer se encim reducira. Nastali imin reagira z vodo v končna produkta aldehyd in amonijak. Regeneracija (oksidacija) encima poteka z molekularnim kisikom, ki se reducira v vodikov peroksid. Splošna reakcija MAO katalize je naslednja:



Enačba 1

V poznih šestdesetih letih so se začeli pojavljati indici, da morata obstajati vsaj dve obliki MAO. Prvi posredni dokaz je predstavil Johnston, ki je ugotovil, da klorgilin inhibira degradacijo serotoninina, medtem ko metabolizem benzilamina in feniletilamina ostane nespremenjen [15]. Komplementarni prispevek sta štiri leta kasneje objavila Knoll in Magyar, ki sta ugotovila, da selegilin inhibira degradacijo benzilamina in fenetilamina, medtem ko se serotonin normalno metabolizira [16]. Kasneje so imunohistokemične in elektroforetske študije potrdile obstoj dveh oblik MAO, ki so ju poimenovali MAO-A in MAO-B. Prva oblika je tista, ki ima za substrat serotonin in jo selektivno inhibira klorgilin, druga pa ima za substrat feniletilamin in jo selektivno inhibira selegilin [17].

6.1. Razporeditev po tkivih

Prvotno so razporeditev MAO po tkivih preučevali na osnovi barvne reakcije s tetrazolijevimi solmi. Kasneje so metodo določevanja izboljšali tako, da so za zaznavo uporabili vodikov peroksid, ki nastaja pri fiziološki katalizi encima. Ta metoda je skupaj z uporabo selektivnih inhibitorjev omogočila ločevanje med izoobliko A in B. Kasneje so lokalizacijo posamezne oblike dokazali še z uporabo specifičnih protiteles.

Ugotovili so, da se MAO-A nahaja v telesih, dendritih in končičih kateholaminergičnih nevronov, zlasti v področju lokus ceruleusa, medtem ko je prisotnost v substanci nigri komaj zaznavna. Za razliko od A izooblike, so najvišjo prisotnost MAO-B zaznali v področju serotonergičnih nevronov jeder rafe, histaminergičnih nevronov in celicah glije [18]. Razporeditev je zanimiva zato, ker je serotonin slab substrat za B izoobliko. Na podlagi tega dejstva so predpostavili zaščitno vlogo MAO, ki naj bi imela funkcijo vzdrževanja integritete nevrona. Tako naj bi na primer MAO-A razgrajevala serotonin, ki se privzame v adrenergični nevron, MAO-B pa noradrenalin, ki se privzame v serotonergični nevron. Poleg tega naj bi v celicah glije prisotna MAO-B ščitila monoaminergični sistem pred učinkovanjem eksogenih aminov [17].

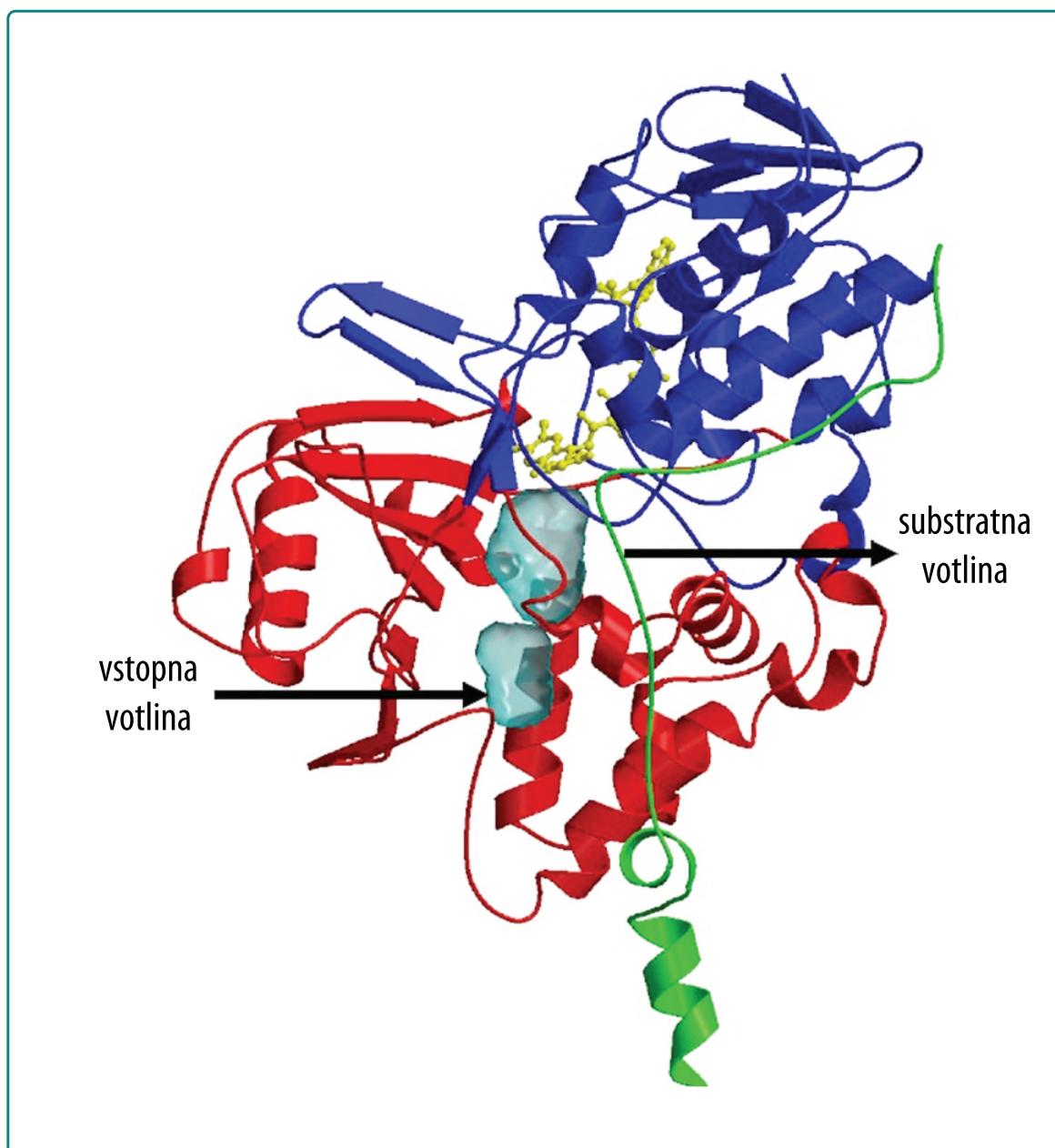
Izven CŽS najdemo MAO-A v placenti in gastrointestinalnem traktu, kjer ščiti telo pred škodljivimi učinki zaužitih feniletilaminov, kot je tiramin. Absorbirani feniletilamini izpodrivatevajo noradrenalin iz veziklov, kar vpliva na krčenje žilja in srca in močno poviša krvni tlak. Nespecifična inhibicija MAO povzroči deaktivacijo tega zaščitnega sistema, zato lahko uživanje določene hrane vodi v hipertenzivno krizo. V angleški literaturi ta pojav imenujejo *cheese reaction*, saj imajo določeni siri visoko vsebnost tiramina. Za placentno MAO so ugotovili, da ščiti plod, saj intrauterina administracija povzroči splav [19]. MAO-B je izven CŽS prisotna predvsem v trombocitih, kjer njena natančna funkcija ni poznana. Stopnjo inhibicije trombocitne MAO-B lahko uporabimo kot pokazatelj (*marker*) za določanje stopnje njene inhibicije v možganih [18].

6.2. Struktura in aktivno mesto

Diplomska naloga preučuje selektivni inhibitor MAO-B, zato se bomo v nadaljevanju posvetili predvsem B izoobliki, MAO-A pa omenili le za primerjavo. Tridimenzionalna struktura MAO-B je bila določena leta 2001 [20], z izboljšano ločljivostjo pa so jo določili leta 2004 [21]. Ugotovljeno je bilo, da MAO-B kristalizira kot homodimer, pri čemer sta se pojavili dve kristalni oblici encima. Stična površina je razmeroma velika (15 %), vstopa do

aktivnega mesta, pa sta na nasprotnih straneh od stične površine. Ta dejstva nakazujejo na to, da je encim tudi fiziološko v dimerni obliki.

Encim je v membrano vezan s C-terminalnim heliksom (489-500), medtem ko ima citosolna stran globularno strukturo (ostanki 1-488). Citosolni del proteina ima substratno domeno in domeno, ki veže kofaktor flavinadenindinukleotid (FAD). Substratna domena ima 700 \AA^3 veliko votlino, ki sega od površine encima do kofaktorja. Je izrazito hidrofobna in z zanko iz štirih aminokislin razdeljena na dva dela. Vstopna votlina ima volumen približno 290 \AA^3 ,



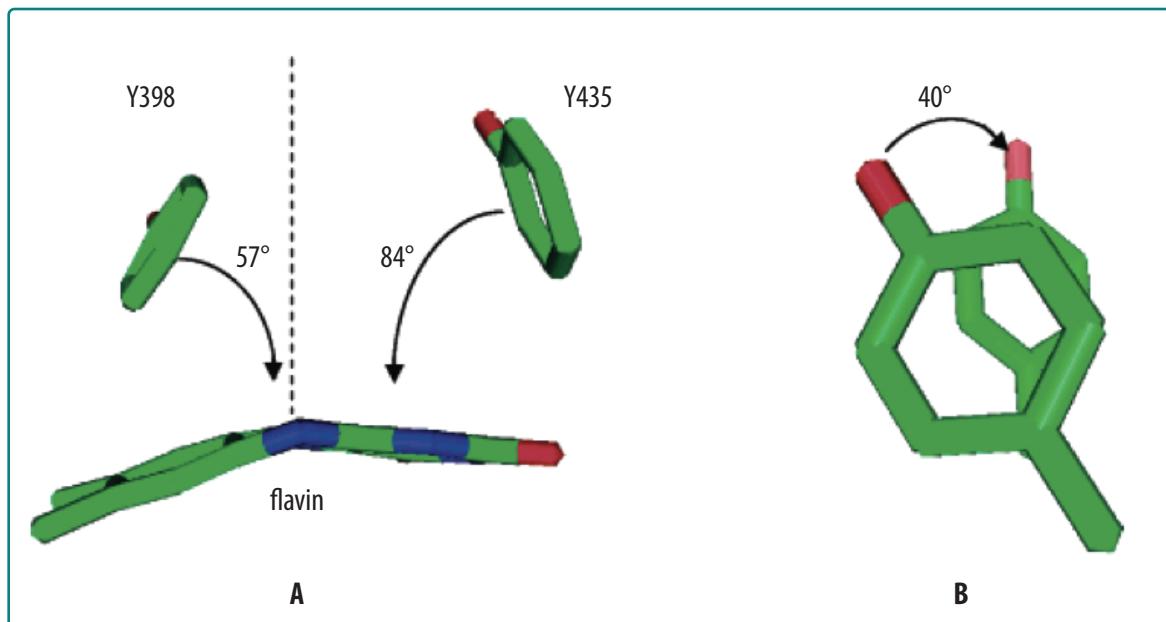
Slika 11 - Struktura MAO-B [21].

Z modro je obarvana domena, ki kovalentno veže FAD (v rumeni barvi), z rdečo je obarvana domena, ki veže substrat. S svetlo modro sta označeni substratna in vstopna votilna. C-terminalna membranska domena je v zeleni barvi.

substratna votlina pa približno 390 \AA^3 . Zanka, ki ju ločuje, služi kot nekakšen vratar, ki se v odvisnosti od strukture substrata oz. inhibitorja odpre ali zapre [22].

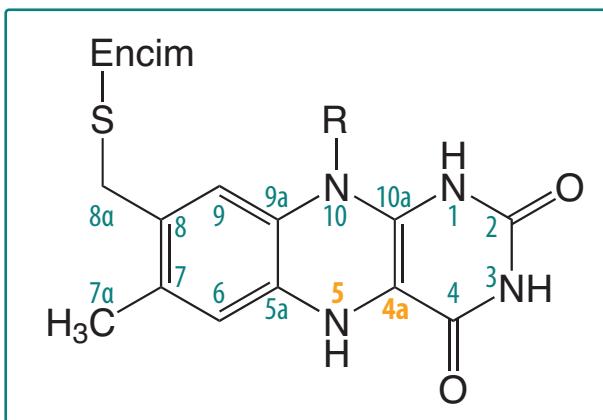
Za razliko od B oblike ima MAO-A le eno votlino, ki je večja od substratne votline MAO-B in je velika približno 550 \AA^3 . Aktivno mesto MAO-A ima bolj okroglo obliko, medtem ko je substratna votlina MAO-B ploščata. Zaradi tega ima substrat v MAO-B manj konformacijske prostosti kot v MAO-A. Naštete razlike v zgradbi aktivnega mesta naj bi igrale ključno vlogo pri prepoznavi substrata in s tem določale substratno specifičnost obeh encimov. Manjši nevrotransmiterji (benzilamin, feniletilamin) se presnavljajo z MAO-B, medtem ko se nekoliko večji presnavljajo z MAO-A (noradrenalin, serotonin). Za dopamin naj bi imela oba encima približno enako afiniteto, vendar so ugotovili, da se pri človeku preferenčno presnavlja z MAO-B [23]. To je v skladu s terapevtskimi učinki selektivnih MAO-B inhibitorjev, ki so uporabni v terapiji Parkinsonove bolezni, medtem ko MAO-A inhibitorji niso.

V neposredni bližini flavina, ki je bistven za katalitično aktivnost, je t.i. aromatska kletka iz dveh tirozinskih ostankov. Ostanka sta postavljena skoraj pravokotno na re stran flavina. Točkovne mutacije enega izmed dveh tirozinov so pokazale, da obstaja povezava med k_{cat}/K_m razmerjem in interakcijsko energijo dipolega momenta substratnega amina. Eden izmed zaključkov te študije je, da je funkcija aromatske kletke pravilna orientacija substrata in



Slika 12 - Aromatska kletka in orientacija tirozinskih ostankov [24].

A) Pogled na strukturo aromatske kletke od spodaj. S te strani se substrat približa encimu. Viden je centralni N5 flavina. **B)** Pogled na aromatsko kletko s strani.



Slika 13 - Označevanje atomov flavina.

rahlo upognjen, kar izboljša nukleofilnost dušika N5 in poveča elektrofilnost ogljika C4a.

6.3. Mehanizem delovanja MAO

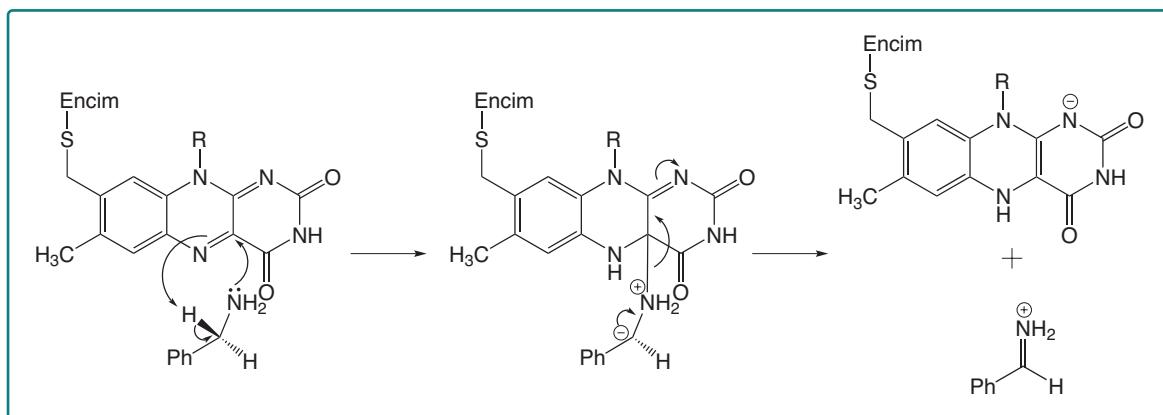
Po do sedaj znanih podatkih substrat v aktivno mesto encima vstopa v deprotonirani obliki, kar je smiselno, saj je vstop nabitega amina v hidrofobno votlino energetsko izjemno neugoden. Ta podatek je pomemben, ker so substrati za MAO v citosolu večinoma prisotni v pozitivno nabiti obliki. Vstopna votlina MAO je namreč blizu negativno nabite membrane, kar poveča lokalno koncentracijo protoniranih aminov. To je tudi verjeten razlog, zakaj so v kinetičnih študijah vrednosti K_m za membransko vezan encim manjše kot za izolirano obliko v raztopini detergenta [22].

Zaradi lažjega ločevanja med mehanizmom oksidativne deaminacije in inhibicije smo se prvega odločili poimenovati substratni mehanizem, drugega pa inhibitorski mehanizem. Substratni mehanizem poteka po splošni shemi opisani v *reakciji 1*. Pri reakciji pride do cepitve alfa ogljikovega protona s substrata, pri čemer se na flavin preneseta tudi dva elektrona. Protonirani imin nato odda svoj proton flavin semikinonu, da nastaneta imin in flavin hidrokinon (reducirana oblika flavina). Regeneracija encima z molekularnim kisikom lahko poteče pred ali po disociaciji substrata. Za obe izobliki je značilno, da disociacija poteče po regeneraciji, izjema je le reakcija feniletilamina z MAO-B, kjer regeneracija poteče pred disociacijo.

Cepitev C-H vezi je možna na tri različne načine. Za aminokislinske oksidaze je znano, da se vodik odcepi v obliki hidridnega iona, zato so sprva sklepali na podoben mehanizem [25]. Druga možnost je radikalni mehanizem s homolitsko cepitvijo C-H vezi, tretja pa odcep v obliki protona in nastanek substratnega karboaniona (polarni nukleofilni mehanizem). Da bi ločili med temi mehanizmi, so izvedli poskuse s substituiranimi

polarizacija amina, kar poveča nukleofilnost dušika, ki tako lažje napade C4a flavina. Točkovna menjava tirozina za fenilalanin ni imela večjega vpliva na hitrost reakcije, zato sklepajo, da aromatska kletka ni udeležena v reakciji [24]. Posebnost flavina v monoaminoksidazi v primerjavi z drugimi flavinoksidazami je, da je v reducirani obliki

benzilamini, kjer so na para mesto fenilnega obroča vezali elektronprivlačne skupine. Ugotovili so, da se v primeru MAO-A hitrost reakcije poveča, kar je v skladu s polarnim nukleofilnim mehanizmom [26]. Za razliko od MAO-A, se pri B obliki efekt elektronprivlačnih skupin ne pozna v tolikšni meri [27]. Ti dve študiji sta ovrgli možnost hidridnega mehanizma, saj bi bil učinek elektronprivlačnih substituent na hitrost katalize ravno obraten. Dodaten dokaz za odcep vodika v obliki protona daje kinetični izotopski efekt devterija, ki znaša od 5 do 10, kar kaže tudi na to, da je odcep protona omejujoč faktor pri katalizi [26, 27]. Običajno so v encimskih reakcijah, kjer pride do odcepa protona, udeležene bazične aminokisline, vendar teh v aktivnem mestu monoamin-oksidaze ni. Vrednost pK_a benzilaminskega vodika na alfa ogljiku je ocenjena na približno 25 [21]. Kot je omenjeno v prejšnjem poglavju o strukturi monoamin-oksidaze, je analiza flavina v aktivnem mestu pokazala, da je flavinski obroč odklonjen za približno 30° po osi N5-N10. Posledica te konformacije je višja elektronska gostota na N5, ki ima bolj sp^3 kot sp^2 značaj, in nižja elektronska gostota na C4a, ki naj bi bil mesto nukleofilnega napada substratnega amina. Študije so med drugim tudi pokazale, da ima N5 v reduciranem flavinu pK_a okoli 24. Iz tega Edmondson sklepa, da bi bil N5 primerna baza, ki bi odstranila proton, medtem ko bi se substratni amin vezal na C4a flavina. Posredni dokaz za napad substrata na C4a flavina je Li dokazal s farnezolom. Farnezol se veže v aktivno mesto na podoben način kot benzilamin, vendar ima namesto aminske hidroksilno skupino, ki je

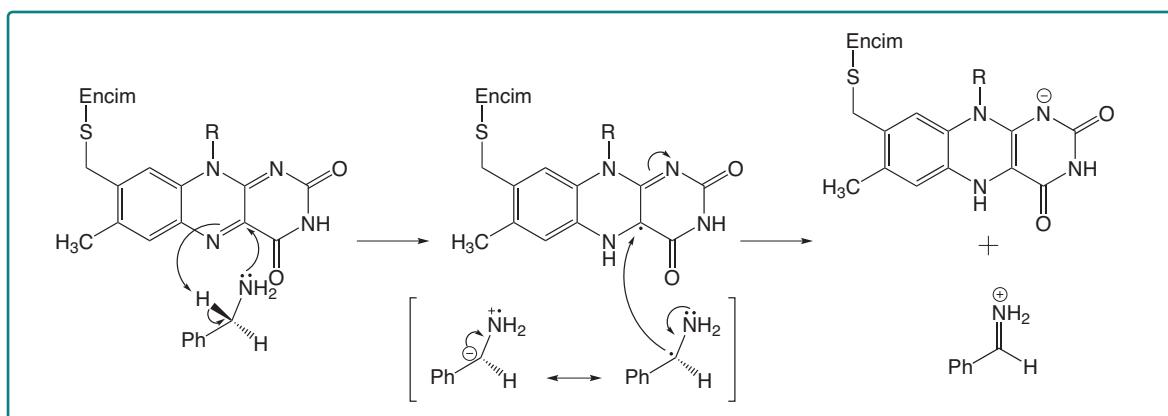


Slika 14 - Miller-Edmondsonov polarni nukleofilni mehanizem [26].

V prvi stopnji substratni amin napade C4a flavina, hkrati pa se proton veže na flavinski N5. V končni stopnji pride do premika elektronov v flavinu in odcea imina. Imin se nato v citosolu z vodo neencimatsko pretvori v aldehyd in amonijak, in tako da končni produkt oksidativne deaminacije.

manj nukleofilna in zato reakcija ne poteče. Dokaz je dodatno podkrepil poskus z amino derivatom farnezola, pri katerem je reakcija uspešno potekla.

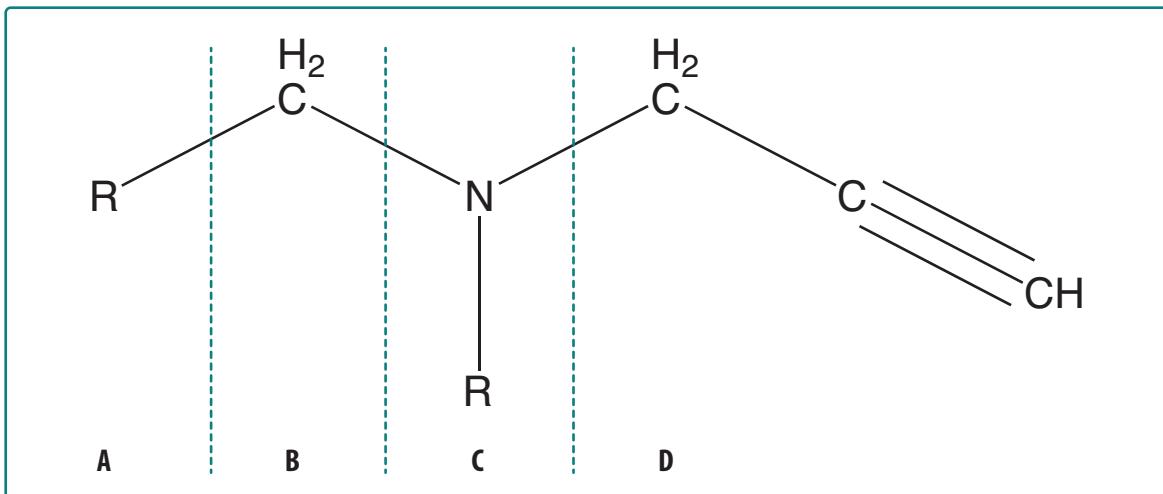
Drugi možen mehanizem je radikalni oz. *single electron transfer* (SET) mehanizem, ki ga zagovarja Silverman [28]. Premisa, na kateri stoji ta predlog, je, da naj bi enoelektronska oksidacija substrata povzročila labilnost C-H vezi in s tem omogočila odstranitev protona. Žal do sedaj nobena študija ni zaznala ustreznega radikala, tudi poročila o odkritju tirozilnega radikala so se v poznejših poskusih z elektronsko paramagnetno resonanco (EPR) izkazala za napačna [29]. Ta ugotovitev je skladna z ugotovitvami skupine, ki je točkovno mutirala tirozin v fenilalanin in ni ugotovila bistvenega vpliva na hitrost reakcije. V primeru, da bi bil kateri izmed tirozinov aromatskih kletk udeležen v katalizo, bi pričakovali spremembo kinetike. Dodaten dokaz proti SET mehanizmu je vpliv magnetnega polja na kinetiko reakcije. Običajno je pri radikalnih reakcijah vpliv znaten, vendar je bil v primeru MAO katalize zanemarljiv.



Slika 15 - Silvermanov radikalni mehanizem [28].
Imin po reakciji neencimatsko hidrolizira v aldehid in amonijak.

7. SAR acetilenskih inhibitorjev

Znani so selektivni in neselektivni inhibitorji monoamin-oksidaze, hkrati pa so lahko reverzibilni ali irevezibilni. Znanih je več vrst ireverzibilnih inhibitorjev, ki se ločijo po mehanizmu delovanja. Najbolj tipični predstavniki posamezne vrste so tramilcipromin (ciklopropilni), iproniazid (hidrazinski) in selegilin (acetilenski oz. propargilaminski). Diplomska naloga se osredotoča na ireverzibilni acetilenski inhibitor rasagilin. Pripoma gilin izvira iz imena propargilamin, ki označuje strukturo tipa $\text{NR}_1\text{R}_2\text{-CH}_2\text{-CCH}$ in je skupna vsem acetilenskim inhibitorjem. Rasagilin je bil sprva poznan kot R-propargil aminoindan (R-PAI). Značilnost rasagilina je, da selektivno inhibira B izobliko, zato se uporablja v terapiji Parkinsonove bolezni. MAO-A inhibitorji delujejo kot antidepresivi, vendar je njihova uporaba omejena predvsem zaradi pojava neželenega učinka ob uživanju hrane, bogate s tiraminom.



Slika 16 - Struktura prototipnega acetilenskega (propargilaminskega) inhibitorja MAO [30].

Za kovalentno inhibicijo encima sta nujna dela C in D, medtem ko dela A in B določata specifičnost za A in B izobliko.

Odnos med strukturo in delovanjem acetilenskih inhibitorjev MAO so preučevali Kalir in sodelavci [30]. Ugotovili so, da je del A najmanj specifičen. Spremembe tega dela dajejo substance, kot so klorgilin, pargilin, selegilin in desmetilpargilin. Namesto dela A in B lahko uporabimo tudi indanski skelet, kar je značilno za rasagilin. Pri tem se selektivnost in moč inhibicije v primerjavi s pargilinom ne spremeni. Če namesto indanskega skeleta uporabimo fenciklidin ali metilfenciklidin, inhibicije encima ne zaznamo več. Iz tridimenzionalne strukture aktivnega mesta so kasneje ugotovili, da so take spojine prevelike za vezavo v substratno votlino.

V praksi so znani substrati in inhibitorji, ki imajo v delu B eno, dve ali tri CH₂ skupine. Daljša alkilna veriga za vezavo v encim ni ugodna, v splošnem pa velja, da se večje molekule vežejo v MAO-A (klorgilin), manjše pa v MAO-B (selegilin) [16].

Večje spremembe v delu C niso ugodne, saj so aktivni le metilirani in demetilirani analogi. Substitucija amina z višjimi alkili ali ciklopropilom praktično izniči delovanje. Čeprav Kalir in sodelavci poročajo o izboljšanju inhibicije pri N-metiliranih derivatih, je to odvisno od posameznega inhibitorja. Za rasagilin so ugotovili, da N-metilacija povzroči odmak molekule vode, ki sicer z N-H tvori vodikovo vez v aktivnem mestu. Rezultat odmika je slabša vezava v encim in s tem padec moči inhibicije.

Del D je najbolj konzervativen del acetilenskih inhibitorjev. Za delovanje je nujno potrebna acetilenska skupina, ki mora biti od amina ločena s CH₂ mostičkom. Uvedba etilena namesto acetilena daje neaktivne substance. Swett in sodelavci so ugotovili, da terminalni acetilenski vodik najbrž ni udeležen pri reakciji, saj so aktivni tudi alkil substituirani propargilamini [30, 31].

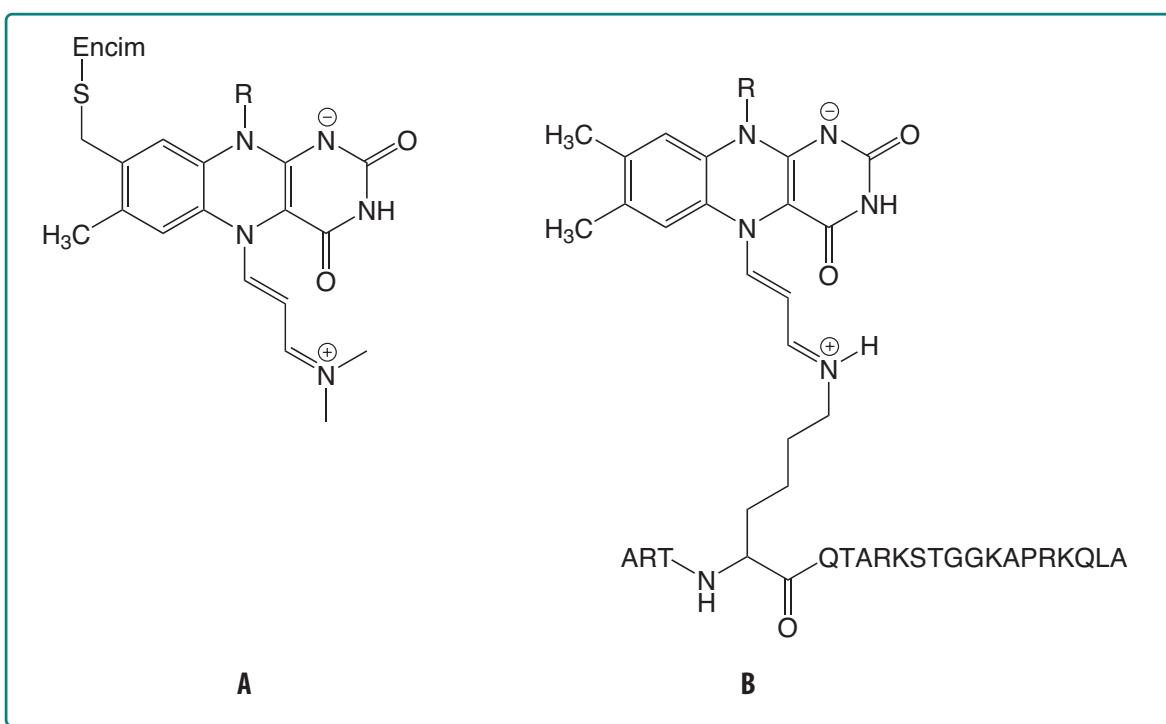
Preglednica IV - Najpogosteje uporabljeni acetilenski inhibitorji MAO.

Vse učinkovine imajo skupen propargilaminski del in so na dušiku večinoma metilirane. Izjema je le rasagilin, čigar N-metil derivat je manj učikovit. Iz struktur je razvidno, da MAO-A lahko veže večje substrate, kot je na primer klorgilin.

učinkovina	struktura
klorgilin Klorgilin je selektivni inhibitor MAO-A in se uporablja v raziskavah.	
pargilin Je selektivni inhibitor MAO-B, uporabljan zlasti v raziskavah.	
N,N-dimetilpropargilamin Prototipni acetilenski inhibitor MAO.	
selegilin Selektivni inhibitor MAO-B. Od rasagilina se razlikuje po tem, da so njegovi metaboliti derivati amfetamina.	
rasagilin Klinično uporabljan selektivni inhibitor MAO-B.	

8. Mehanizmi inhibicije MAO

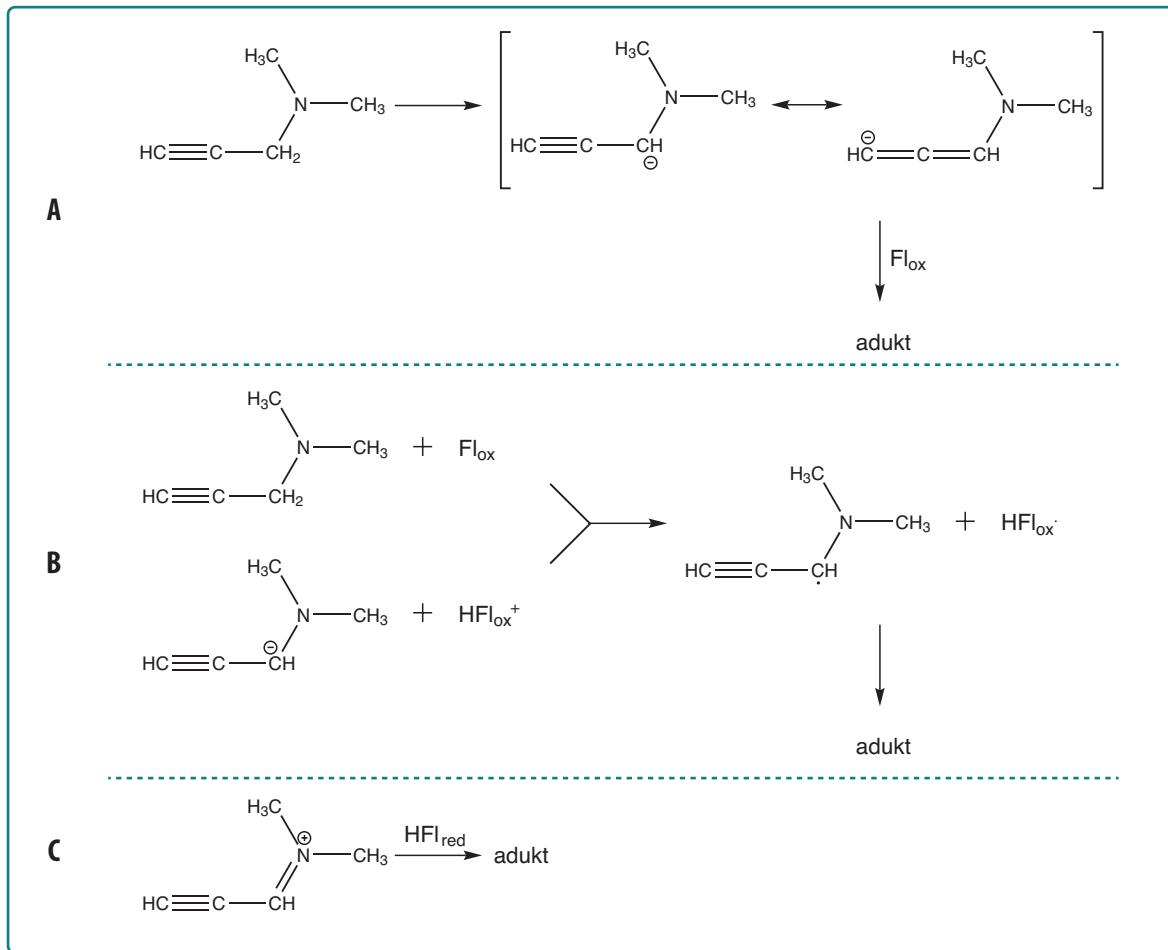
O natančnem mehanizmu inhibicije monoamin-oksidaz je bilo objavljenih izjemno malo člankov. Dokončnega zaključka in mehanistične razlage inhibicije ni. Eden izmed najboljših in najbolj citiranih člankov na to temo je Maycockov članek iz leta 1976 [32]. V njem avtor predpostavlja tri možne produkte inhibicije, na katere sklepa iz ultravijoličnih (UV) spektrov. Iz sintetiziranih modelnih spojin in primerjav njihovih spektrov je zaključil, da je najbolj verjetna struktura A na sliki 17. Gartner in sodelavci so izvedli fotoreakcijo med flavinom in N,N-dimetilpropargilaminom in z nuklearno magnetno resonanco (NMR) potrdili strukturo, ki jo je predlagal Maycock [32, 33]. Kljub temu tega ne gre jemati kot definitven dokaz za pravilnost predpostavljene strukture, saj so do produkta prišli s fotoreakcijo in ne s poskusom na encimu. Boljši dokaz o pravilnosti Maycockove strukture je dala NMR analiza produkta reakcije med histon-demetylazo in acetilenskim inhibitorjem. Histon-demetylaza je tako kot MAO flavoencim, ki je dovzet za inhibicijo z acetilenskimi inhibitorji [34].



Slika 17 - Rezultat NMR analize strukture acetilenskega inhibitorja s flavinom [32, 34]. Strukturo **A** so določili Gartner in sodelavci ob fotoreakciji dimetilpropargilamina s flavinom. Strukturo **B** so določili Scewczuk in sodelavci po vezavi acetilenskega inhibitorja na flavin histon demetylaze.

Bloch in sodelavci so opisali reakcijo, pri kateri pride najprej do premestitve acetilena v derivat alena in nato do reakcije s flavinom. Pri monoamin-oksidazi ta mehanizem ne pride v poštev, saj ne daje ustreznega produkta reakcije. Dodaten

razlog proti je tudi nekonjugiranost alena, zaradi česar je manj dovzeten za napad z nukleofili. Pregledni članek o mehanizmih reakcij na flavinu opisuje možne pare reakcij acetilenskih inhibitorjev s flavinom, kot je razvidno iz slike.



Slika 18 - Možni mehanizmi nastanka adukta med acetilenskim inhibitorjem in flavinom [32].

A) V tem primeru reducirani inhibitor reagira z oksidiranim substratom, B) slika predstavlja radikalski mehanizem, C) možnost pri kateri pride najprej do oksidacije substrata, ki nato reagira z reduciranim flavinom. Glede na trenutno znane podatke za mehanizem oksidacije substratov, je izmed predpostavljenih ta mehanizem najbolj smiseln.

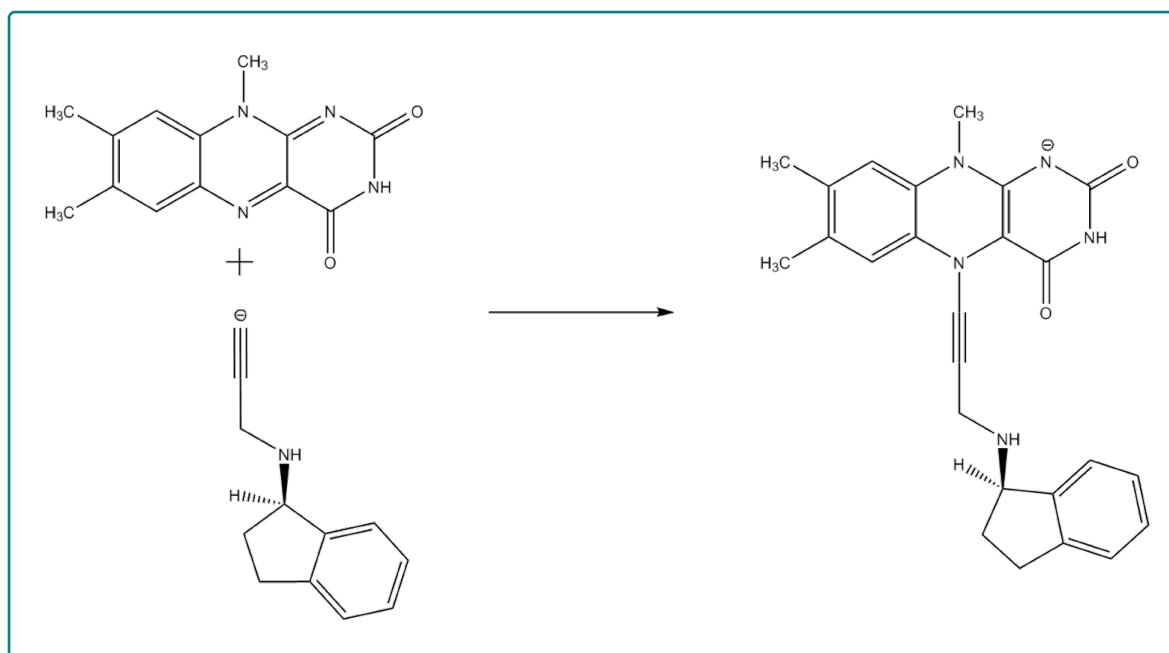
Smiselnost prvega mehanizma težko upravičimo, ker mora v tem primeru proton z inhibitorja odstraniti druga baza in ne flavin, ki pa je v aktivnem mestu ni. Druga možnost je radikalna in predstavlja izjemen izziv za kvantno kemijo, zato se tej nismo posvečali. Tretja možnost pa je oksidacija inhibitorja po kateremkoli mehanizmu in posledična reakcija z reduciranim flavinom. Ta reakcija je še najbolj smiselna, saj je oksidiran inhibitor dober substrat za Michaelovo adicijo, poleg tega pa je reducirani flavin zaradi zvite konformacije dober nukleofil. Mehanizem, po katerem se substrat najprej oksidira in nato kovalentno veže, je znan in potrjen za hidrazinske MAO inhibitorje. Isti vir navaja, da je mehanizem nastanka adukta pri acetilenskih inhibitorjih podoben, vendar ni navedeno, kje naj bi tak mehanizem potrdili [35].

Namen dela in delovne hipoteze

Z računskimi metodami kvantne kemije bomo konstruirali reakcijski diagram za mehanizem inhibicije MAO B, ki smo ga sami predpostavili. Pri tem bomo zaradi kompleksnosti sistema in posledične velike potrebe po računski moči uporabili izoliran flavin in izračune opravili z minimalnim baznim setom v plinski fazi. Delovni hipotezi, ki ju želimo preveriti, sta:

➡ **1) Rasagilin lahko reagira s flavinom preko acetinilidnega karboaniona**

Po odstranitvi protona z acetylne skupine po kateremkoli mehanizmu pride do napada acetinilida na N5 flavina. Reakcija poteka po spodnji shemi.



Slika 19 - Predpostavljeni acetinilidni mehanizem.

➡ **2) Prosta energija za reakcijo ustreza eksperimentalni vrednosti**

Eksperimentalna vrednost za konstanto reakcijske hitrosti med MAO-B in rasagilinom je znana in znaša $k_{inact}=53,3 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ [32]. Iz konstante smo z uporabo teorije prehodnega stanja (enačbi 2 in 3) izračunali aktivacijsko prosto energijo, ki znaša 20,83 kcal/mol. Preveriti želimo, ali bo kvantno-kemijsko izračunana aktivacijska energija primerljiva.

$$\Delta G = k_b T N_A \ln \frac{k_b T}{k_{inact} h} \quad \text{Enačba 2}$$

$$k_{inact} = \frac{k_b T}{h} e^{-\Delta G/k_b T N_A} \quad \text{Enačba 3}$$

Metode

Reaktivnost rasagilina pri reakciji s flavinom smo proučevali z uporabo kvantno-kemijskih metod. Pri delu smo potrebovali zmogljiv večprocesorski računalnik in primerno programsko opremo.

Delo je potekalo tako, da smo po pregledu literature s programom najprej izdelali 3D strukture flavina in rasagilina. Nato smo obe strukturi ločeno geometrijsko optimizirali s pomočjo programa Gaussian. Po ločeni optimizaciji reaktantov smo strukturi postavili na določeno razdaljo. To razdaljo smo pri nadaljnji optimizaciji definirali kot fiksno. To pomeni, da se optimizirajo vse prostostne stopnje, razen definirane razdalje. Po končani optimizaciji Gaussian izračuna ničelno vibracijsko energijo za sistem. Te vrednosti smo narisali v odvisnosti od definirane razdalje. Iz grafa smo nato razbrali, na kateri razdalji se nahaja prehodno stanje in Michaelis-Mentenov kompleks (najnižja energija produktov). Razlika v ničelni vibracijski energiji med temo dvema vrednostima je aktivacijska energija.

9. Strojna oprema

Računske metode kvantne kemije so procesorsko, pomnilniško in diskovno zahtevni izračuni. Večinoma smo uporabljali računalnik z naslednjo konfiguracijo, izračune pa smo opravljali tudi na gruči računalnikov Vrana na Kemijskem inštitutu.

Preglednica V - Specifikacije relevantne strojne in programske opreme računalnika.

oprema	specifikacije
procesor	2x 4-jedrni Xeon 2,53 GHz
pomnilnik	4x 2 GB 1066 MHz dvokanalni RAM
operacijski sistem	Ubuntu Linux 9.10 (kernel 2.6.31-21-generic)
molden verzija	v4.8
gaussian verzija	g03

10. Programska oprema

Operacijski sistem na računalniku je bil Ubuntu Linux 9.10 64-bit z jedrom 2.6.31-21-generic, ki omogoča boljše paraleliziranje.

10.1. Molden

Za konstrukcijo tridimenzionalnih struktur flavina, rasagilina in adukta smo uporabljali program Molden [36]. Molden nam za dano strukturo izpiše interne koordinate posameznih atomov v z-matriki, kar je pomembno za kasnejši uvoz v Gaussian [37]. Molden smo uporabili tudi za animacijo geometrijske optimizacije in izvoz slik.

Z-matrike smo oblikovali tako, da je bil prvi atom v z-matriki acetinilidni ogljik, drugi atom N5 na flavinu, ostali pa so bili postavljeni relativno glede na ta dva atoma. Tako smo kasneje v programu Gaussian lažje določili razdaljo, ki je med geometrijsko optimizacijo ostala nespremenjena (reakcijska koordinata).

Z-matriko iz programa Molden smo po izvozu v enostavnem urejevalniku besedila opremili tako, kot zahteva optimizacijski program Gaussian 03.

10.2. Vhodna datoteka za Gaussian

Vhodna datoteka za Gaussian 03 na začetku vsebuje navodila o tem, kam naj shranjuje začasne izračune (*checkpoint file*), kolikšno količino sistemskega pomnilnika ima na voljo in koliko procesorskih jeder naj uporabi. Nato sledi ukazna vrstica oziroma specifikacija izračuna. V njej določimo nivo teorije, bazni set in vrsto izračunov, ki naj jih program opravi. Tej vrstici sledi še vrstica za komentar, ki mora biti od specifikacije izračuna in nadalnjih podatkov ločena z odstavkom. Po odstavku sledi vrstica, v kateri določimo naboj celotnega sistema in multipliciteto, tej pa sledi z-matrika, ki določa konfiguracijo atomov v prostoru. Odvisno od vrste izračuna lahko z-matriki sledijo tudi podatki o vezeh in kotih, ki med izračunom ostajajo konstantni.

```
%chk=ts-20a
%mem=2gb
%nproc=8
# HF/3-21G opt=(ModRedundant)

Geometrijska optimizacija na razdalji 2.0A.

-1 1
c
n   1 nc2
c   2 cn3      1 cnc3
c   3 cc4      2 ccn4      1 dih4
c   2 cn5      3 cnc5      4 dih5
c   5 cc6      2 ccn6      3 dih6
n   6 nc7      5 ncc7      2 dih7
```

Slika 20 - Primer glave vhodne datoteke za Gaussian.

10.3. Gaussian 03

Gaussian je program za kvantno kemijo, ki omogoča paletu različnih kvantno-kemijskih izračunov. John Pople in sodelavci program razvijajo že več kot trideset let, kar ustreza tisočletju programerskega dela. Programskega paketa je napisan v programskejem jeziku Fortran, koda je napisana modularno in omogoča paralelizacijo. Ideja programskega paketa je, da en program generira izhodne podatke iz drugega, kar pomeni, da programi med seboj komunicirajo. Koncept je deloma zgodovinskega značaja, saj so bile v času začetka razvoja programa diskovne in pomnilniške zmogljivosti bistveno bolj omejene kot danes. S programom Gaussian 03 (g03) smo računali ničelno vibracijsko energijo za flavin in rasagillin na različnih razdaljah ter za njun adukt. Izračuni so bili narejeni na Hartree-Fock (HF) nivoju z majhnim baznim setom, pri katerem je vsaka orbitala Slaterjevega tipa

opisana s tremi Gaussovimi funkcijami (STO-3G). S tem smo skrajšali čas računanja in kljub temu dobili zadovoljive podatke o tem, na kateri vrednosti reakcijske koordinate ima sistem prehodno stanje. Z zbranimi podatki smo konstruirali reakcijski diagram, ki ima na abscisi razdaljo med atomoma, na ordinati pa Gibbsovo prosto reakcijsko energijo.

11. Izračuni kemijske reaktivnosti

Kvantna kemija je sinonim za reševanje Schrödingerjeve enačbe za elektrone, medtem ko gibanje jeder upošteva zakone klasične fizike. Vhodni podatki so koordinate jeder in izbran nivo kvantne teorije, kot rezultat pa dobimo energijo, elektronsko gostoto in z njo povezane količine (*observable*). Poleg energije dobimo tudi za vsak atom sile in druge odvode energije glede na koordinate, kar je pomembno pri vibracijski analizi in določitvi prehodnega stanja. Pri semiempiričnih metodah Austin model 1 (AM1) in Parameterized model 3 (PM3) veliko elektronskih integralov zanemarimo ali nadomestimo z eksperimentalnimi spektroskopskimi podatki, medtem ko pri *ab initio* metodah vse parametre izračunamo iz prvih principov. Kvantna kemija zahteva ogromne količine procesorskega časa. Ideja pri izračunu kemijske reaktivnosti je, da izračunamo energijsko razliko med prehodnim stanjem in energijo reaktantov. Višina bariere je merilo za kemijsko reaktivnost. Višja kot je bariera, počasnejša je reakcija. Določevanje minimuma reaktantov in prehodnega stanja je numerični postopek, kjer premikamo koordinate jeder tako dolgo, da pridemo v minimum ali na sedelno točko. Postopek geometrijske optimizacije je za fleksibilne sisteme, kot je aktivni center MAO-B, izjemno zahteven in dolgotrajen, saj zahteva nekaj sto povnovitev (iteracij).

Konstanto reakcijske hitrosti določimo z računalniškimi programi, ki numerično rešujejo Schrödingerjevo enačbo. Splošna stacionarna, časovno neodvisna Schrödingerjeva enačba ima obliko:

$$\hat{H}\Psi_{(x,y,z)} = E\Psi_{(x,y,z)}$$

Enačba 4

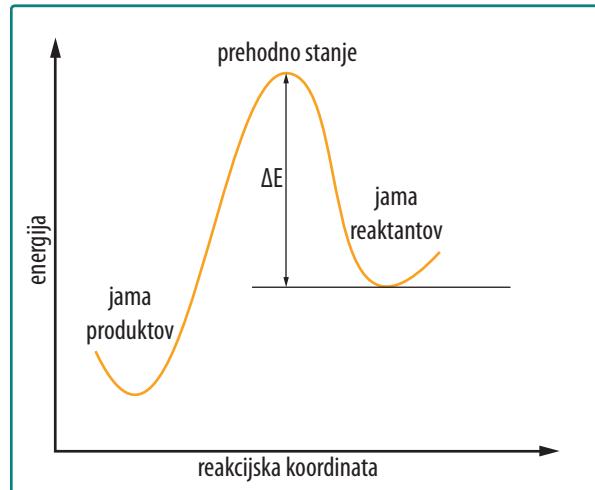
\hat{H} je Hamiltonov energijski operator, $\Psi_{(x,y,z)}$ valovna funkcija, E pa celotna energija sistema in je vsota potencialnih elektrostatskih interakcij med elektroni in jedri ter kinetične energije elektronov. Hamiltonov operator za atome in molekule vsebuje kinetično energijo elektronov in parske elektrostatske interakcije med elektroni in jedri, med elektroni in

elektroni ter med jedri. Pri tem predpostavljamo, da jedra mirujejo (Born–Oppenheimerjev približek) in da je gibanje elektronov mnogo počasnejše od hitrosti svetlobe. Osnovno elektronsko stanje sistema opisuje valovna funkcija z najnižjo energijo [38].

Za kemijske reakcije je v veliki večini primerov zanimivo le osnovno elektronsko stanje. Vsaki geometriji jeder pripada le ena vrednost energije osnovnega elektronskega stanja. Ta vrednost energije kot funkcije nuklearnih koordinat se imenuje osnovna Born–Oppenheimerjeva hiperploskev (BO hiperploskev). Za N-atomsko molekulo je BO hiperploskev $3N$ dimenzionalna funkcija kartezičnih koordinat in $3N-6$ dimenzionalna funkcija internalnih koordinat. Analiza hiperploskve v smislu določanja minimumov (reaktanti in produkti) in sedelnih točk (prehodna stanja) je ključno orodje za določanje ravnotežnih geometrij, razlik v (prosti) energiji in kemijske reaktivnosti. Rešitve Schrödingerjeve enačbe (valovne funkcije Ψ_i in njim pripadajoče energije E_i) opisujejo določen sistem in omogočajo izračun različnih parametrov sistema. Kemijsko reaktivnost reakcij, ki potekajo na osnovni Born–Oppenheimerjevi površini, modeliramo tako, da izračunamo razlike v prosti energiji med prehodnim stanjem (TS) in reaktanti (R). Pri tem predpostavimo:

- ➡ da so reaktanti v ravnotežju s prehodnim stanjem,
- ➡ da so kvantni efekti zaradi gibanja atomskih jeder majhni,
- ➡ da je ponovno prečkanje bariere zanemarljivo.

V kondenzirani fazi je sistem skoraj vedno v ravnotežju vzdolž reakcijske koordinate. Reaktanti, prehodno stanje in produkti tako tvorijo ravnotežni sistem. Ker je prosta energija produktov nižja od proste energije reaktantov, bo po zelo dolgem času sistem zaključil v jami produktov. Teorija prehodnega stanja ima za osovo predpostavko, da so reaktanti in prehodno stanje v ravnotežju. Tako ko sistem doseže sedelno točko energije na hiperploskvi, gre v jamo produktov.



Slika 21 - Diagram teorije prehodnega stanja.

Na sliki je prikazan najbolj enostaven reakcijski diagram po teoriji prehodnega stanja. Iz jame reaktantov pridemo lahko v jamo produktov tudi po poti, ki ima vmes več lokalnih minimumov.

Pri obravnavi kemijske reaktivnosti v kondenzirani fazi je pomembna tudi vključitev polarne okolice. Eksplisitna solvatacija in termično povprečenje, ki naj bi dalo razlike v prosti energiji (termodinamska integracija, termodinamska perturbacija), je za *ab initio* obravnavo prezahtevna. Zato so razvili metode, ki dajejo prosto energijo solvatacije na aproksimativnem nivoju. Za te izračune uporabljam metodo reakcijskega polja topila in Langevinove dipole. Zaradi pomanjkanja časa teh izračunov nismo izvedli.

Hidratacijo se upošteva z uporabo enačbe 5. ΔG je aktivacijska prosta energija, ki združuje prosto energijo aktivacije (E_a), energijo ničelnega vibracijskega nivoja (ZPE) ter razliko prostih energij hidratacije prehodnega stanja ($\Delta G_{\text{hidr(TS)}}$) in reaktantov ($\Delta G_{\text{hidr(R)}}$):

$$\Delta G = E_a + ZPE + \Delta G_{\text{hidr(TS)}} - \Delta G_{\text{hidr(R)}} \quad \text{Enačba 5}$$

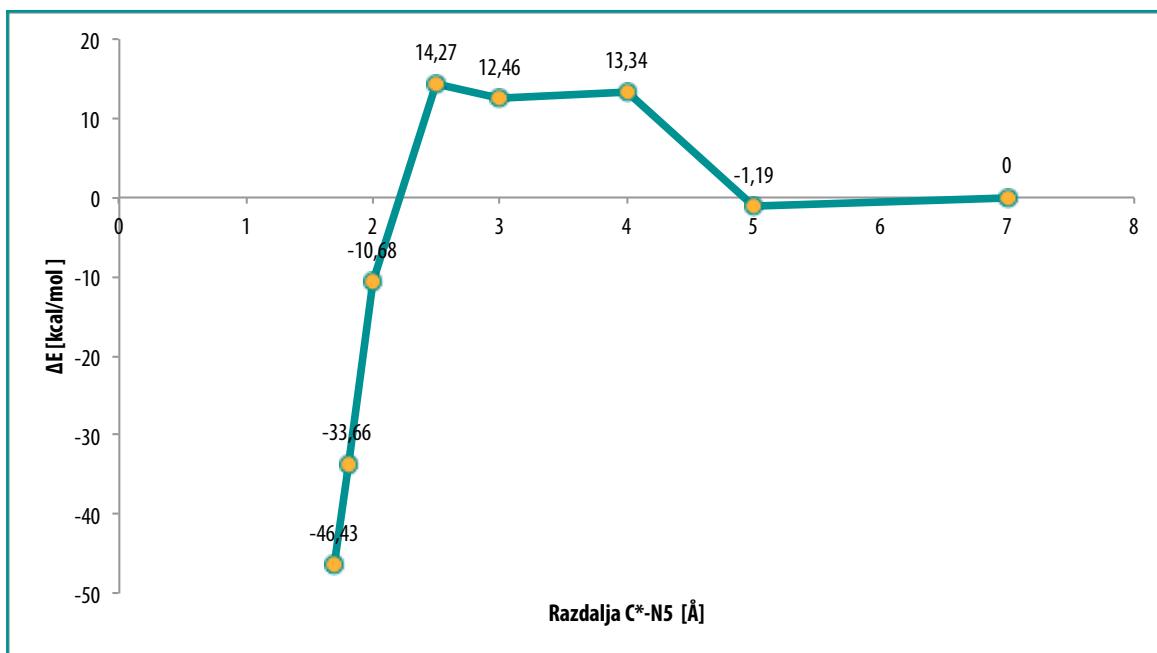
Enačba, ki v našem primeru opisuje zvezo med konstanto hitrosti in energijo sistema je:

$$k_{\text{inact}} = \frac{k_b T}{h} e^{-\Delta G/k_b T N_A} \quad \text{Enačba 6}$$

Z h je označena Planckova konstanta, s k_b Boltzmanova konstanta, z N_A pa Avogadrova konstanta. Pri izračunu Born-Oppenheimerjeve površine za kemijsko reakcijo rasagilina s flavinom smo za reakcijsko koordinato izbrali razdaljo med N5 v flavinu in terminalnim C atomom rasagilina (acetinilid). Za dano C-N razdaljo smo vse ostale prostostne stopnje optimizirali. Geometrijska optimizacija je računski postopek, s katerim določimo tisto geometrijo sistema, ki ima najnižjo energijo. Energija pa je odvisna od koordinat vseh atomov. Program torej spreminja razporeditev atomov tako dolgo, dokler ne najde geometrije z najnižjo energijo. Ab initio izračune smo opravili na Hartree-Fockovem nivoju z baznim setom STO-3G. Bazni set predstavlja izbor molekulskih orbital, ki jih ponazorimo z atomskimi orbitalami Slaterjevega ali Gaussovega tipa. Energijski profil za kemijsko reakcijo smo računali tako, da smo spreminali reakcijsko koordinato, pri čemer so bile optimizirane vse ostale geometrijske prostostne stopnje. Izjema je le točka, ki ustreza reaktantom (R) in adaktu, kjer je bila narejena popolna geometrijska optimizacija. Najvišja točka vzdolž reakcijske koordinate ustreza prehodnemu stanju (TS).

Rezultati in razprava

S programom Gaussian 03 sem izračunal energijo za sistem flavin z rasagilinom na različnih razdaljah med N5 flavina in acetinilidnim ogljikom rasagilina. Iz podatkov sem konstruiral spodnji reakcijski diagram. Optimizacija je bila opravljena na ab initio nivoju z uporabo minimalnega baznega seta (STO-3G). Obravnavani sistem je velik, poleg tega pa izjemno fleksibilen. Za tipično lokacijo reaktantov oz. točke s fiksno C-N5 razdaljo sem porabil sedemdeset iteracij, zato bi uporaba višjih nivojev teorije privedla do več mesecev trajajočih izračunov. Običajno iz izračunov na majhnem baznem setu identificiramo reakcijsko koordinato, ki ustreza stanju reaktantov, prehodnemu stanju in produktom. Nato izračune ponovimo še z uporabo večjih baznih setov. Tako dobimo rezultat, ki je bolj skladen z eksperimentalnimi podatki, saj gre za boljšo numerično aproksimacijo Schrödingerjeve enačbe. Iz diagrama z STO-3G baznim setom je razvidno, da je razdalja, pri kateri sistem preide čez prehodno stanje, približno 2,5 Å. Nadaljnji izračuni temeljijo na predpostavki, da je prehodno stanje na tej razdalji. Kot reaktante smo vzeli geometrijo, pri kateri je reakcijska koordinata (razdalja C-N5) 5,0 Å, za produkt pa smo vzeli geometrijo, ki te razdalje med optimizacijo nima eksplisitno določene. Minimum reaktantov ustreza Michaelis-Mentenovemu kompleksu, ki ga tvorita flavin in rasagilin.

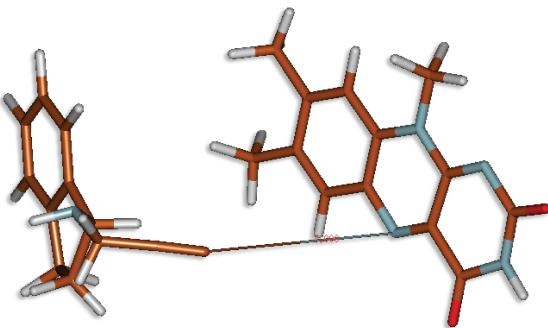


Slika 22 - Izračunane energije sistema flavin in rasagilina na STO-3G nivoju.

Iz diagrama je razvidno, da na razdalji 5 Å pride do tvorbe Michaelis-Mentenovega kompleksa, zato smo energijo na tej razdalji upoštevali kot energijo reaktantov. Energija sistema začne pod 5 Å naraščati proti energiji prehodnega stanja. Pod 2,5 Å pride do hitrega upada energije, saj nastane vez med acetinilidnim ogljikom in N5. Energija produkta je za skoraj 50 kcal/mol nižja kot energija reaktantov.

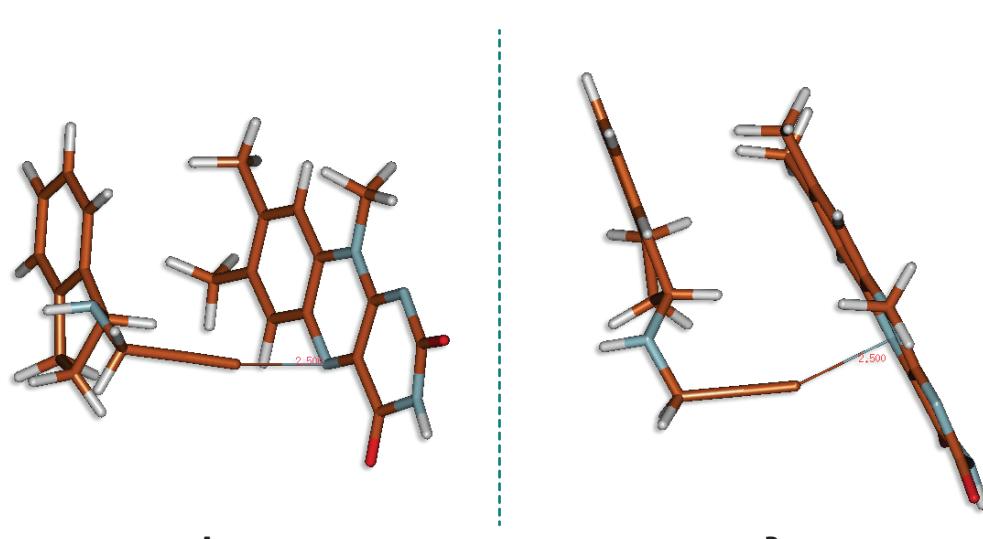
Slika na desni prikazuje optimizirano geometrijo reaktantov. Izračuni potekajo v plinski fazi, zato so možne le interakcije med danima molekulama. Iz optimizirane strukture vidimo, da pride do vzporedne orientacije benzenovih obročev, kar je ugodno s stališča π - π interakcij. V primerjavi s strukturo prehodnega stanja in produkta je potrebno omeniti popolno planarnost oksidiranega flavinskega obroča. Li in sodelavci poročajo o ukrivljenosti flavina, vendar ni pojasnjeno, ali gre za oksidirano ali reducirano obliko [24].

V prehodnem stanju sta benzenova obroča še vedno poravnana, zaradi bližine negativnega naboja acetinilida pa prihaja do deformacije na desni strani flavina, kar je vidno iz desne slike. Izračunana aktivacijska energija znaša 15,46 kcal/mol. Ta vrednost se glede na vhodne parametre in predpostavljen mehanizem za silo ujema z eksperimentalno ugotovljeno bariero. Ujemanje ni točno, vendar zadostno, da potrjuje pravilnost predpostavljenega acetinilidnega mehanizma.



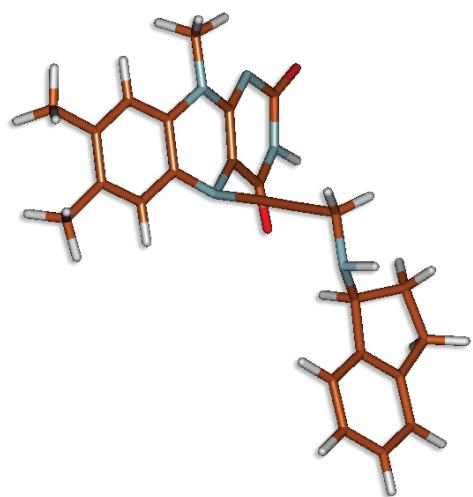
Slika 23 - Optimizirana struktura reaktantov.

Molekuli sta bili pred optimizacijo postavljeni v poljubno orientacijo. Razdalja med njima je bila na začetku nastavljena na 7,0 Å.



Slika 24 - Optimizirana struktura v okolici prehodnega stanja.

Na sliki je struktura optimizirane geometrije flavina in rasagilina na razdalji tej razdalji. A - pogled s strani, B - pogled z vrha.



Slika 25 - Optimizirana struktura produkta.

Pri produktu je C-N5 razdalja približno 1,7 Å, kar ustreza enojni C-N vezi. Obenem pride do ukrivljenja flavinskega obroča po osi N5-N10, pri čemer N5 postane sp³ hibridiziran. Acetil ohrani svojo linearno strukturo, zato sklepamo, da ne pride do premika elektronov, ampak se trojna vez ohrani. Razvidno je tudi, da se med propargil-aminskim dušikom in CH₂ mostičkom ne ustvari dvojna vez.

Sklep

Glede na delovne hipoteze lahko naredimo naslednje zaključke:

- ➡ **1) acetinilidni mehanizem nastanka adukta flavina z rasagilinom je verjeten,**
- ➡ **2) izračunana prosta aktivacijska energija za reakcijo nastanka adukta znaša 15,46 kcal/mol.**

Eksperimentalna aktivacijska energija znaša 20,83 kcal/mol. S stališča izračunane proste energije je predlagani acetinilidni mehanizem mogoč. Argument, ki acetinilidnega mehanizma ne zagovarja, je, da z nuklearno magnetno resonanco niso nedvoumno potrdili strukture adukta. Obstaja možnost, da interpretacija spektrov ni bila izvedena pravilno. Izziv za prihodnost je ponovitev spektroskopskega dela, začrtanega v referencah [32-34] v smislu dokaza produkta na sliki 17.

Možnih je še več drugih mehanizmov: radikalski, polarni nukleofilni in hidridni. Prvi kandidat za nadaljne študije bi bil polarni nukleofilni mehanizem, saj ga zagovarja večina avtorjev. Teoretična študija tega mehanizma je bila na benzilaminu že izvedena [39], vendar bi jo lahko ponovili s substrati, ki imajo vezane elektronprivlačne skupine na para mestu benzilamina. Zanimivo bi bilo, če bi kot substrat uporabili nevrotransmiterje dopamin, noradrenalin ali serotonin, saj benzilamin v telesu ni prisoten. S konstrukcijo enačbe odvisnosti med elektronprivlačnim efektom skupine na para mestu in konstanto hitrosti reakcije bi lahko izračune primerjali z eksperimentalnimi vrednostmi in tako dobili globlji vpogled v naravo reakcije. Drugi izziv za preučevanje predstavlja ireverzibilna inhibicija z različnimi inhibitorji, kjer je zaradi precejšnje nedorečenosti mehanizma preučevanje bistveno težje. Zato menimo, da bi morali za pridobitev novega znanja o mehanizmu inhibicije izvesti podobne laboratorijske študije, kot so bile izvedene za substrate. To vključuje študije vpliva elektronprivlačnosti para substituente, kinetične študije v magnetnem polju in študije EPR. Z rezultati teh bi lahko dobili več znanja o mehanizmu oksidacije inhibitorja in tvorbi kovalentne vezi s flavinom, hkrati pa bi lahko rezultate primerjali s kvantno-kemijskimi izračuni. Končni namen prihodnjega dela je načrtovanje novih ireverzibilnih inhibitorjev, kjer bo kateri izmed kandidatov postal spojina vodnica.

Eksperimentalno je sorazmerno težko povedati, po katerem mehanizmu teče reakcija pri substratih ali inhibitorji. Meritve za eksperimentalne in simulacijske študije, povezane z

nuklearnimi kvantnimi efekti, nam povedo, kolikšna je relevanca kvantne narave gibanja jeder za hitrost ali termodinamiko vezave. Za MAO-B so narejene študije H/D kinetičnih izotopnih efektov, ki so merilo za prispevek nuklearnega tuneliranja k celokupni hitrosti procesa. V prihodnosti bomo kvantizirali enačbe gibanj za relevantna atomska jedra in ovrednotili izotopske efekte. S tem bomo razlikovali med posameznimi možnimi reakcijski mehanizmi.

Naši izračuni bodo v prihodnosti usmerjeni v obravnavo encima s stališča kvantne mehanike in hkrati molekuske mehanike (QM/MM). To pomeni, da bo reaktivni del encima obravnavan na nivoju kvantne kemije, medtem ko bosta ostanek proteina in topilo obravnavana na nivoju molekulske mehanike. V kvantomehanskem podsistemu bomo kvantizirali gibanja relevantnih vodikovih jeder (npr. z integracijo po poti), kar nam bo dalo vpogled v prispevek nuklearnega tuneliranja. Hierarhični opis sistema bo omogočil termično povprečenje z metodo molekulske dinamike in kot rezultat bomo imeli boljše ujemanje z eksperimentom. Skupaj z eksperimentalnim delom bomo dobili boljši vpogled v delovanje encima, kar nam bo omogočilo načrtovanje novih inhibitorjev z želenimi lastnostmi. Računalniško modeliranje farmakološko relevantnih procesov je in bo prispevalo k zmanjšanju števila sintez in poskusnih živali pri načrtovanju novih zdravilnih učinkovin.

Literatura

1. Waxman S.G., *Fundamentals of the Nervous System* v knjigi *Clinical Neuroanatomy*, Waxman S.G., McGraw Hill: New York, 2010: 1-6.
2. Guyton A.C. and Hall J.E., *Organization of the Nervous System, Basic Functions of Synapses, “Transmitter Substances”* v knjigi *Textbook of medical physiology*, Guyton A.C. and Hall J.E., Elsevier Saunders: Philadelphia, 2006: 555-71.
3. Wichmann T. and Delong M.R., *Neurotransmitters and Disorders of the Basal Ganglia* v knjigi *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects 7th ed.*, Siegel G., et al., Elsevier: New York, 2006: 761-90.
4. Waxman S.G., *Control of Movement* v knjigi *Clinical Neuroanatomy*, Waxman S.G., McGraw Hill: New York, 2010: 183-94.
5. Cajal S.R.Y.; Available from: “Santiago Ramón y Cajal - Nobel Lecture”. Nobelprize.org. 1 Jul 2010 http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1906/cajal-lecture.html.
6. Vizi E.S. and Lendvai B., *Synaptic and Nonsynaptic Release of Transmitters* v knjigi *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Neurotransmitter Systems*, Vizi E.S., Springer: New York, 2008: 102-11.
7. Nestler E.J., Hyman S.E., and Malenka R.C., *Synaptic Transmission* v knjigi *Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience*, Nestler E.J., Hyman S.E., and Malenka R.C., McGraw Hill: New York, 2001: 59-84.
8. Holz R.W. and Fisher S.K., *Synaptic Transmission and Cellular Signaling: An Overview* v knjigi *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects 7th ed.*, George Siegel R.W.A., Scott Brady, Donald Price, Elsevier: New York, 2006: 167-83.
9. Goodman L.S., Gilman A., and Brunton L.L., *Neurotransmission and the Central Nervous System* v knjigi *Goodman & Gilman’s Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill Medical: New York, 2008: 293-320.

10. Nestler E.J., Hyman S.E., and Malenka R.C., *Catecholamines v knjigi Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neurosciece*, Nestler E.J., Hyman S.E., and Malenka R.C., McGraw Hill: New York, 2001: 167-90.
11. Harsing L.G., *Dopamine and the Dopaminergic Systems of the Brain v knjigi Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Neurotransmitter Systems*, Vizi E.S., Springer: New York, 2008: 151-70.
12. Kuhar M.J., Minneman K., and Muly E.C., *Catecholamines v knjigi Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects 7th ed.*, Siegel G., et al., Elsevier: New York, 2006: 211-25.
13. Hare M.L., *Tyramine oxidase: A new enzyme system in liver*. Biochem J, 1928. **22** (4): p. 968-79.
14. Gerlach M., Riederer P., and Youdim M.B.H., *Effects of Disease and Aging on Monoamine Oxidases A and B v knjigi Monoamine oxidase inhibitors in neurological diseases*, Lieberman A.N., CRC Press, 1994, 1994: 21-30.
15. Johnston J.P., *Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue*. Biochem Pharmacol, 1968. **17**(7): p. 1285-97.
16. Knoll J. and Magyar K., *Some puzzling pharmacological effects of monoamine oxidase inhibitors*. Adv Biochem Psychopharmacol, 1972. **5**: p. 393-408.
17. Westlund K.N., *The Distribution of Monoamine Oxidases A and B in Normal Human Brain v knjigi Monoamine oxidase inhibitors in neurological diseases*, Lieberman A.N., CRC Press, 1994, 1994: 1-20.
18. Shih J.C., Chen K., and Ridd M.J., *Monoamine oxidase: from genes to behavior*. Annu Rev Neurosci, 1999. **22**: p. 197-217.
19. Koren Z., Pfeifer Y., and Sulman F.G., *Induction of legal abortion by intra-uterine instillation of pargyline hydrochloride (eutonyl)*. J Reprod Fertil, 1966. **12**(1): p. 75-9.
20. Binda C., Newton-Vinson P., Hubalek F., Edmondson D.E., and Mattevi A., *Structure of human monoamine oxidase B, a drug target for the treatment of neurological disorders*. Nat Struct Biol, 2002. **9**(1): p. 22-6.

21. Binda C., Hubalek F., Li M., Edmondson D.E., and Mattevi A., *Crystal structure of human monoamine oxidase B, a drug target enzyme monotypically inserted into the mitochondrial outer membrane*. FEBS Lett, 2004. **564**(3): p. 225-8.
22. Edmondson D.E., Binda C., and Mattevi A., *Structural insights into the mechanism of amine oxidation by monoamine oxidases A and B*. Arch Biochem Biophys, 2007. **464**(2): p. 269-76.
23. Glover V., Sandler M., Owen F., and Riley G.J., *Dopamine is a monoamine oxidase B substrate in man*. Nature, 1977. **265**(5589): p. 80-81.
24. Li M., Binda C., Mattevi A., and Edmondson D.E., *Functional Role of the Aromatic Cage in Human Monoamine Oxidase B: Structures and Catalytic Properties of Tyr435 Mutant Proteins*. Biochemistry, 2006. **45**(15): p. 4775-84.
25. Umhau S., Pollegioni L., Molla G., Diederichs K., Welte W., Pilone M.S., and Ghisla S., *The x-ray structure of D-amino acid oxidase at very high resolution identifies the chemical mechanism of flavin-dependent substrate dehydrogenation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(23): p. 12463-8.
26. Miller J.R. and Edmondson D.E., *Structure-activity relationships in the oxidation of para-substituted benzylamine analogues by recombinant human liver monoamine oxidase A*. Biochemistry, 1999. **38**(41): p. 13670-83.
27. Walker M.C. and Edmondson D.E., *Structure-activity relationships in the oxidation of benzylamine analogues by bovine liver mitochondrial monoamine oxidase B*. Biochemistry, 1994. **33**(23): p. 7088-98.
28. Lu X., Ji H., and Silverman R.B., in *Flavins and Flavoproteins*, Chapman S. P.R., Scrutton N., Editor. 2002, Agency for Sci. Publ.: Berlin. p. 817-30.
29. Rigby S.E., Hynson R.M., Ramsay R.R., Munro A.W., and Scrutton N.S., *A stable tyrosyl radical in monoamine oxidase A*. J Biol Chem, 2005. **280**(6): p. 4627-31.
30. Kalir A., Sabbagh A., and Youdim M.B., *Selective acetylenic ‘suicide’ and reversible inhibitors of monoamine oxidase types A and B*. Br J Pharmacol, 1981. **73**(1): p. 55-64.

31. Swett L.R., Martin W.B., Taylor J.D., Everett G.M., Wykes A.A., and Gladish Y.C., *Structure-activity realtions in the pargyline series*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1963. **107**(New Reflections on Monoamine Oxidase Inhibition): p. 891-98.
32. Maycock A.L., Abeles R.H., Salach J.I., and Singer T.P., *The structure of the covalent adduct formed by the interaction of 3-dimethylamino-1-propyne and the flavine of mitochondrial amine oxidase*. Biochemistry, 1976. **15**(1): p. 114-25.
33. Gartner B., Hemmerich P., and Zeller E.A., *Structure of flavin adducts with acetylenic substrates. Chemistry of monoamine oxidase and lactate oxidase inhibition*. Eur J Biochem, 1976. **63**(1): p. 211-21.
34. Szewczuk L.M., Culhane J.C., Yang M., Majumdar A., Yu H., and Cole P.A., *Mechanistic analysis of a suicide inactivator of histone demethylase LSD1*. Biochemistry, 2007. **46**(23): p. 6892-902.
35. O'brien E.M. and Tipton K., *Biochemistry and Mechanism of Action of Monoamine Oxidases A and B v knjigi Monoamine oxidase inhibitors in neurological diseases*, Lieberman A.N., CRC Press, 1994, 1994: 31-76.
36. Schaftenaar G. and Noordik J.H., *Molden: a pre- and post-processing program for molecular and electronic structures*. J Comput Aided Mol Des, 2000. **14**(2): p. 123-34.
37. Gaussian 03 R.C., M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu,

- A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pople, Gaussian, Inc., Wallingford Ct, 2004.
38. Koller J., *Struktura atomov in molekul: osnove kvantne mehanike, atomi*. 1987: Univerza v Ljubljani.
39. Erdem S.S., Karahan O., Yildiz I., and Yelekci K., *A computational study on the amine-oxidation mechanism of monoamine oxidase: insight into the polar nucleophilic mechanism*. Org Biomol Chem, 2006. **4**(4): p. 646-58.