

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA ZAKŠEK

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA ZAKŠEK

**RAČUNALNIŠKO MODELIRANJE KVANTNE NARAVE
VEZAVE HISTAMINA NA HISTAMINSKI H₂-RECEPTOR**

**COMPUTER MODELING OF QUANTUM NATURE OF
HISTAMINE BINDING TO HISTAMINE H₂ RECEPTOR**

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo sem opravljala na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo na Medicinski fakulteti Univerze v Ljubljani in Kemijskem inštitutu v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Mojce Kržan, dr. med. in somentorstvom doc. dr. Janeza Mavrija, dipl.ing. kem.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. Mojci Kržan in doc. dr. Janezu Mavriju za strokovno pomoč, nasvete, podporo ter izredno prijetno delovno okolje na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

Prav tako se zahvaljujem Mateju Repiču, za ves trud in strokovno pomoč pri izdelavi moje diplomske naloge.

Hvala Špeli, Živi, Mateji, Sari ter ostalim prijateljem in sošolcem, ki ste, vsak na svoj edinstven način, pripomogli k nepozabnim študentskim letom.

Hvala Luka, ker mi stojiš ob strani in mi znaš ob vsakem trenutku narisati nasmeh na obraz.

In še največja zahvala, ki je namenjena članom moje družine, ki ste mi omogočili študij, verjeli vame in me podpirali na vsakem koraku. Hvala vam.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Mojce Kržan, dr. med. in somentorstvom doc. dr. Janeza Mavrija, dipl. ing. kem.

Maja Zakšek

KAZALO VSEBINE

KAZALO SLIK	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
POVZETEK	VIII
ABSTRACT	IX
ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV	X
1. UVOD	1
1.1. RECEPTORJI	1
1.1.1 Histaminski receptorji.....	2
1.2. LIGANDI.....	5
1.2.1 Histamin.....	5
1.3. INTERAKCIJA RECEPTOR – LIGAND.....	9
1.3.1 Kovalentne interakcije	9
1.3.2 Nevalentne interakcije.....	9
1.4. VODA.....	11
1.4.1 Struktura vode.....	11
1.4.2 Tvorba vodikovih vezi med vodo in polarnimi topljenci v organizmu	11
1.5 DEVTERIRANJE	12
1.6 RAČUNSKA KEMIJA	14
1.6.1 Modeli atomov, molekul in molekulska grafika	14
1.6.2 Preiskovanje površine potencialne energije atomov in molekul - geometrijska optimizacija – energijska minimizacija	14
1.6.3 Opis atomov in molekul – molekulska mehanika (MM).....	14
1.6.4 Kvantnomehanski pristopi (QM).....	15
2. NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE	16
3. METODE IN OPREMA	17
3.1 STROJNA OPREMA	17
3.2 PROGRAMSKA OPREMA	17
4. POSTOPEK DELA	18
4.1 IZRAČUN PROSTE ENERGIJE HIDRATACIJE.....	19
4.1.1 Priprava vhodnih datotek	19
4.1.2 Geometrijska optimizacija za vodik.....	19
4.1.3 Geometrijska optimizacija za devterij	19
4.2 IZRAČUN PROSTE ENERGIJE INTERAKCIJE HISTAMIN – HISTAMINSKI RECEPTOR H ₂	20
4.2.1 Priprava vhodnih datotek	21
4.2.2 Geometrijska optimizacija	22
4.3 IZRAČUN CELOKUPNE SPREMEMBE VEZAVNE PROSTE ENERGIJE HISTAMINA PO DEVTERIRANJU.....	23
5. REZULTATI IN RAZPRAVA	24
5.1 HISTAMIN V VODNEM OKOLJU	26

5.2 HISTAMIN – HISTAMINSKI RECEPTOR H ₂	29
5.3 HISTAMIN – HISTAMINSKI RECEPTOR H ₂ - VODA	33
6. SKLEP	38
7. LITERATURA	39

KAZALO SLIK

Slika 1: Histaminergični sistem pri človeku	2
Slika 2: Shematska ponazoritev strukture histaminskega receptorja H ₂ in vezave histamina na receptor H ₂	4
Slika 3: Kemijska struktura molekule histamina	6
Slika 4: Tautomerni obliki histamina.....	6
Slika 5: Strukture različnih tautomerov histamina.....	7
Slika 6: Biosinteza histamina.....	7
Slika 7: Presnova histamina, ki poteka pri sesalcih	8
Slika 8: Shematski prikaz hidrofobne interakcije med ligandom in receptorjem	10
Slika 9: Primer hidratacije histamina pri fiziološkem pH.....	12
Slika 10: Tipične vodikove vezi v bioloških sistemih	12
Slika 11: Shematska ponazoritev sprememb razdalj v vodikovi vezi po devteriranju.	13
Slika 12: Ubbelohdejev efekt.....	13
Slika 13: Oznake baznega seta.....	15
Slika 14: Glava vhodne datoteke za program Gaussian09 za enega od izračunov pri računanju proste energije hidratacije.....	18
Slika 15: Zaključek vhodne datoteke za program Gaussian09, v primeru, da želimo definirati dielektrično konstanto okolja	20
Slika 16: Teoretični model vezave histamina na histaminski receptor H ₂	21
Slika 17: Model histamina v interakciji z aminokislinskimi ostanki Asp98, Asp 186 in Thr190 histaminskega receptorja H ₂ , ki smo jih skonstruirani do α -C atoma.....	22
Slika 18: Uporabljena shema za izračun proste energije hidratacije.....	26
Slika 19: Dolžine vezi O-H in N-H pred in po devteriranju	27

Slika 20: Dolžine vodikovih vezi v sistemu histamin-voda.....	28
Slika 21: Shema geometrijske optimizacije.	30
Slika 22: Sprememba razdalje N-H in O-H po devteriranju sistema histamin – vezavno mesto histaminskega receptorja H ₂	30
Slika 23: Sprememba razdalje med donorjem vodika in akceptorjem vodika po devteriranju.....	31
Slika 24: Struktura H-histamina in D-histamina v interakciji z vezavnim mestom receptorja H ₂	32

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I:

Nahajanje histaminskih receptorjev in glavni učinki histamina pri človeku..... 3

Preglednica II:

Uporabljena strojna oprema..... 17

Preglednica III:

Uporabljena programska oprema..... 17

Preglednica IV:

Prosta energija hidratacije histamina v vodnem in devteriranem okolju..... 29

Preglednica V:

Prosta energija interakcije histamina z vezavnim mestom histaminskega receptorja H₂.... 33

Preglednica VI:

Spremembe vezavne proste energije histamina po devteriranju 34

POVZETEK

Histamin je pomemben endogeni mediator, prisoten v večini človeških tkiv in organov. Svoje učinke posreduje preko aktivacije 4 podtipov histaminskih receptorjev: H₁, H₂, H₃ in H₄. Vsi spadajo v veliko skupino s proteinom G sklopljenih receptorjev.

Za modelni sistem smo izbrali histaminski receptor H₂, saj je njegova primarna struktura znana, prav tako pa so z metodo usmerjene mutageneze določili ključne aminokislinske ostanke, ki sodelujejo pri vezavi histamina na receptor H₂. Sestavlja ga 7 hidrofobnih transmembranskih področij. Primarno vezavno mesto za histamin se nahaja v žepu znotraj lipidnega dvosloja in vključuje aminokislinske ostanke iz področij 3 in 5. Pri naših kvantno-kemijskih izračunih smo upoštevali tri za vezavo potrebne aminokislinske ostanke, Asp98, Thr190 and Asp186.

Če vodikove atome, ki so udeleženi v tvorbi vodikovih vezi pri vezavi histamina na receptor H₂, zamenjamo z atomi devterija, pride do spremembe dolžine intermolekularnih in intramolekularnih vezi in posledično do strukturnih sprememb vezavnega mesta na receptorju. Zato se spremeni tudi afiniteta vezave histamina na histaminski receptor H₂.

Izračunali smo celokupno spremembo proste energije vezave histamina na histaminski receptor H₂ po devteriranju.

S tem smo dokazali, da ima vodikova vez ključno vlogo pri vezavi histamina na histaminski receptor H₂.

Ključne besede: histamin, histaminski receptor H₂, vodikova vez, devteriranje, Ubbelohdejev efekt, računska kemija

ABSTRACT

Histamine is an important endogenous mediator present in most human tissues and organs. It exerts its actions by binding to 4 different histamine receptor subtypes: H1, H2, H3 in H4, which are all G protein-coupled receptors (GPCRs).

We used histamine H2 receptor as a model system. Its primary structure is known. Aminoacid residues on the third and fifth transmembrane domains play a crucial role in the binding of histamine to this receptor subtype. For our quantum-chemical study we considered three essential aminoacid residues of the H2 binding site Asp98, Thr190, and Asp186.

If we replace hydrogen atoms involved in binding of histamine to H2 receptor with deuterium atoms, intermolecular and intramolecular distances changes. This leads to structural changes of binding sites on the receptor and ligand, which reflects as a modification of binding affinity of histamine ligand to H2 receptor subtype.

We calculated changes of free energies of histamine binding to H2 receptor upon deuteration.

Hydrogen bonds seems to have crucial role in interaction between histamine and histamine H2 receptor.

Key words: histamine, histamine H2 receptor subtype, hydrogen bond, deuteration, Ubbelohde effect, computational chemistry

ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV

CO ₂	ogljikov dioksid
cAMP	ciklični adenzin-3', 5'-monofosfat
Asp98	aspartat na mestu 98
Asp186	aspartat na mestu 186
Thr190	treonin na mestu 190
GDP	gvanozin-5'-difosfat
IP ₃	inozitol 1,4,5 trifosfat
G _s	stimulatorni gvanin-nukleotid vezavni protein
GTP	gvanozin-5'-trifosfat
HDC	histidin-dekarboksilaza
HNMT	histamin-N-metiltransferaza
DAO	diamino-oksidaza
D ₂ O	devterirana voda
H	vodik
D	devterij
T	tricij
PDB	baza proteinskih struktur (angl. Protein Data Bank)
CSD	baza molekulskih struktur Cambridge (angl. Cambridge Structural Database)
NMR	jedrska magnetna resonanca
PES	površina potencialne energije (angl. potential energy surface)

MM	molekularna mehanika
QM	kvantna mehanika
CPCM	reakcijsko polje topila
GPCR	receptorji sklopljeni s proteinom G (angl. G-protein coupled receptors)

1. UVOD

1.1. RECEPTORJI

Receptorji so beljakovine na celičnih membranah, odgovorne za prepoznavanje in odgovarjanje na kemične signale ter posledično ključen element pri komunikaciji med celicami (1).

John Newport Langley je postavil teorijo, da je »receptorna snov« mesto na celici, ki sprejme kemični dražljaj in izzove biološki odgovor. Z nadaljnjimi raziskavami so teorijo potrdili in receptorje razvrstili na podlagi molekularno – bioloških in farmakoloških lastnosti (2). Med tarče učinkovin spadajo mdr. še encimi in transportni sistemi (3).

Na podlagi molekularne strukture in mehanizma prenosa delimo farmakološke receptorje na štiri razrede: ionski kanali, receptorji sklopljeni s proteinom G, receptorji vezani na kinaze in jedrni receptorji (1).

Razred I: Ionski kanali z vezavnim mestom za ligand so membranski proteini, ki se po strukturi bistveno ne razlikujejo od ostalih ionskih kanalov, vključeno pa imajo mesto za vezavo liganda, ponavadi na zunajcelični strani. Imajo pet transmembranskih domen, v sredini kanala pa zanko, ki ima funkcijo vrat. Po vezavi agonista se spremeni konformacija receptorja in ioni lahko preidejo skozi poro. Nanje se običajno vežejo hitrodelujoči živčni prenašalci (1).

Razred II: Membranski s proteinom G sklopljeni receptorji so sestavljeni iz enojne polipeptidne verige, ki tvori sedem transmembranskih heliksov α , z zunajcelično N-končno domeno in znotrajcelično C-končno domeno. Tretja znotrajcelična zanka predstavlja področje, kjer se receptor skloplja s proteinom G (1).

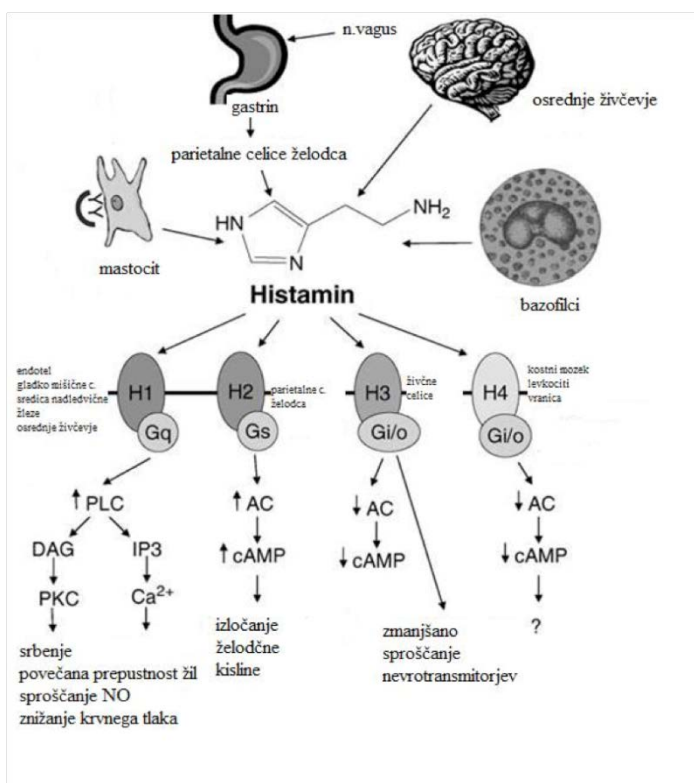
Razred III: Receptorji vezani na kinaze predstavljajo veliko in heterogeno skupino membranskih receptorjev, na katere delujejo predvsem proteinski prenašalci. Sestavljeni so iz zunajcelične in znotrajcelične domene, ki ju povezuje transmembranski heliks (1).

Razred IV: Jedrni receptorji so topni citosolni ali znotraj jedrni proteini, ki po aktivaciji vplivajo na prepisovanje genov (receptorji za steroidne hormone, tiroidne hormone, retinojsko kislino in vitamin D) (1).

1.1.1 Histaminski receptorji

Poznamo štiri različne podtipe histaminskih receptorjev: H₁, H₂, H₃, H₄ (slika 1).

Prvo razdelitev histaminskih receptorjev na podtipa H₁ in H₂ je leta 1966 omogočilo odkritje selektivnih antagonistov; odkritje visoko selektivnih histaminskih antagonistov je vodil do določitve podtipov H₃ in H₄ (4, 5). Vsi podtipi histaminskih receptorjev spadajo v družino s proteinom G sklopljenih receptorjev in se nahajajo na površini celic (6).



Slika 1: Histaminergični sistem pri človeku (prirejeno po 6).

Podtip histaminskega receptorja H₁ je sklopljen s proteinom G_{q/11} in posreduje odgovore predvsem preko aktivacije fosfolipaze C.

Receptor H₂ je sklopljen s proteinom G_s, ki stimulira encim adenilat-ciklazo, ki je odgovorna za sintezo sekundarnega prenašalca cikličnega AMP (cAMP).

Receptorja H₃ in H₄ sta sklopljena s proteinom G_{I/O}, ki inhibira aktivnost adenilat-ciklaze.

Receptor H₃ zavira tudi sproščanje živčnih prenašalcev v osrednjem živčevju (5).

Preglednica I: Nahajanje histaminskih receptorjev in glavni učinki histamina pri človeku (povzeto po 1, 6, 7, 8).

	Nahajanje	Učinki
H ₁	Gladke mišice (krvnih žil, dihalnih poti in prebavnega trakta)	Skrčenje
	Endotelijske celice	Povečana prepustnost žil, povečana sinteza in sproščanje prostaciklinov, povečana sinteza in sproščanje dejavnika, ki aktivira trombocite, Von Willebrandovega dejavnika in dušikovega oksida.
	Sredica nadledvične žleze	Sproščanje adrenalina, noradrenalina in enkefalinov.
	Srce	Manjša moč kontrakcije.
	Osrednji živčni sistem (predvsem neokorteks, hipokampus, nucleus accumbens, talamus in posteriorni hipotalamus)	Emetični učinek (npr. morska bolezen), vzdrževanje budnosti.
H ₂	Parietalne celice želodca	Stimulacija nastajanja in sproščanja HCl.
	Srce	Pozitivni kronotropni in ionotropni učinek.
	Gladke mišice (maternice, dihalnih poti, krvnih žil)	Sprostitev.
	Celice imunskega sistema – limfociti	Inhibicija sinteze protiteles, proliferacije celic T in produkcije citokinov.
	Osrednji živčni sistem	Manjša aktivnost živčnih celic.
H ₃	Osrednji živčni sistem	Inhibicija sproščanja acetilholina, serotonina, dopamina in noradrenalina.
	Periferni živčni sistem	Inhibicija sproščanja noradrenalina iz simpatičnih vlaken v veni safeni, srcu, sapnicah in sapniku.
H ₄	Kostni mozeg in levkociti (nevtrofilci, eozinofilci)	Vloga pri vnetju in kemotaksi.
	Vranica	
	Tanko črevo	
	Mastociti	

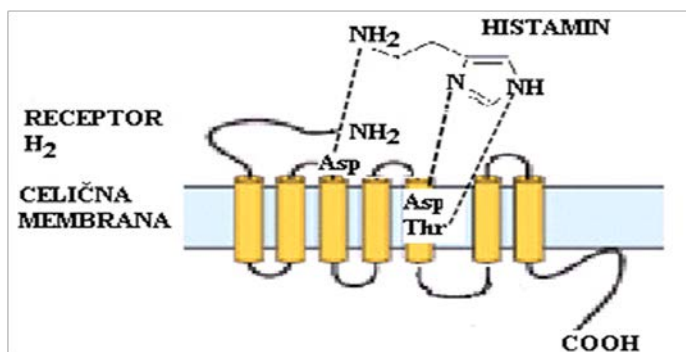
Struktura receptorja H₂:

Aminokislinsko zaporedje histaminskega receptorja H₂ je krajše kot pri večini s proteinom G sklopljenih receptorjev (9). Človeški receptor H₂ ima molekulska maso 40 kDa in ga sestavlja 359 aminokislin. V sestavi receptorja H₂ pri psih, miših, podganah in morskih prašičkih obstaja 83-95 % identičnih aminokislin. Med histaminskim receptorjem H₁ in H₂ pa opazimo le 40% homologijo v aminokislinski sestavi (7).

Receptorji H₂ vsebujejo sedem hidrofobnih transmembranskih področij, znotrajcelično terminalno karboksilno verigo in zunajcelično terminalno aminsko verigo, ki vključuje tudi N-glikozilacijsko mesto. Receptor sestavlja tudi relativno kratka tretja znotrajcelična zanka, ki je značilna za receptorje, ki prenašajo kemično sporočilo preko membranskega encima adenilat-ciklaze. V drugi in tretji zunajcelični zanki se nahajajo cisteinski ostanki, ki tvorijo strukturno pomembne disulfidne vezi (9).

Za prepoznavanje ligandov so ključne aminokisliline na tretjem in petem transmembranskem področju receptorja. Ugotovili so, da je za vezavo in učinek histamina ključen aspartat na mestu 98 (Asp98). Predvideva se, da je to primarno vezavno mesto za pozitivno nabiti dušikov atom alifatske verige histamina. Aspartat na mestu 186 (Asp186) in treonin na mestu 190 (Thr190), ki se nahajata na petem transmembranskem področju, pa naj bi bila pomembna za tvorbo vodikovih vezi z dušikovimi atomi imidazolnega obroča histamina. Dušikov atom imidazolnega obroča N¹ se veže na Asp186, dušikov atom imidazolnega obroča N³ pa na Thr190 (4,7) (slika 2).

Za aktivacijo histaminskega receptorja H₂ sta potrebni proton donorska in proton akceptorska skupina. Priti mora tudi do tautomerizacije molekule histamina.



Slika 2: Shematska ponazoritev strukture histaminskega receptorja H₂ in vezave histamina na receptor H₂ (prirejeno po 7).

Monoprotoniran histamin se receptorju približa kot N³-H tautomerna oblika. Stranska veriga se z NH₃⁺- skupino, preko solnega mostička, veže na Asp98, ki se nahaja na tretjem transmembranskem področju. Ko je stranska veriga zasidrana, pride do nevtralizacije naboja, ki povzroči premik tautomere z mesta N³-H na N¹-H. Dušikov atom imidazolnega obroča N¹ deluje kot proton akceptor in sprejme proton od Asp186, dušikov atom imidazolnega obroča N³ pa se veže na Thr190, ki deluje kot proton akceptor (10, 11).

1.2. LIGANDI

Ligand je molekula, ki se selektivno veže na določeno tkivo in specifično na določen receptor (1). Receptorji za določene učinkovine prepoznajo samo ligande s točno določeno molekulsko strukturo. Komplementarnost specifičnega liganda in vezavnega mesta omogoča proteinom možnost zelo natančnega molekularnega prepoznavanja in povezovanja, kar je ključno pri razlagi mnogih fenomenov v farmakologiji (1).

Ligande, ki se vežejo na receptor in po aktivaciji receptorja povzročijo učinek, imenujemo agonisti. Polni agonisti lahko povzročijo maksimalen učinek, ki ga je določeno tkivo sposobno izvesti; delni agonisti pa ne morejo sprožiti maksimalnega učinka tkiva (1).

Afiniteto liganda je sposobnost liganda, da se veže na določen receptor. Učinkovitost liganda pa zmožnost liganda, da aktivira receptor in izzove učinek. Agonist se lahko veže na isto vezavno mesto kot endogeni ligand, t.i. primarno ali ortosterično vezavno mesto. Redkeje pa se agonist veže na drugo (alosterično ali alotopično) vezavno mesto na molekuli receptorja (12).

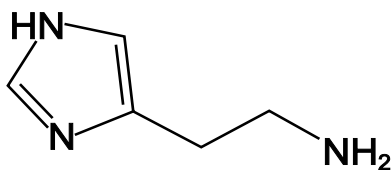
Antagonist se veže na vezavno mesto na receptorju, vendar vezavi ne sledi učinek. Običajno imajo večjo afiniteto do receptorja kot agonisti, njihova učinkovitost pa je nična oziroma zelo nizka (1).

1.2.1 Histamin

Histamin je biogeni amin, ki je prisoten v večini telesnih tkiv. V večjih koncentracijah se nahaja v pljučih, koži in prebavilih. 90 % histamina je shranjenega v zrnih znotraj mastocitov (tkivnih bazofilcev) (1). Histamin se sprošča v vsakem tkivu v telesu, če je le to poškodovano oziroma vneto (13).

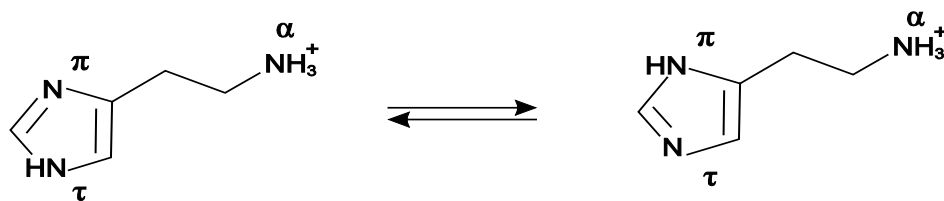
Poleg tega se histamin nahaja tudi v krvi - predvsem v bazofilnih granulocitih, v želodcu, kjer je prisoten v enterokromafinim celicam podobnih celicah, v možganih pa ga najdemo v histaminergičnih nevronih, kjer deluje kot živčni prenašalec.

Molekula histamina (slika 3) je sestavljena iz etilaminskega dela (podobnost z ostalimi monoamini - dopamin, noradrenalin, serotonin) ter imidazolnega dela, ki sodeluje pri tautomeriji.



Slika 3: Kemijska struktura molekule histamina.

Monoprotoniran ali neprotoniran histamin obstajata v dveh tautomernih oblikah, τ in π (slika 4).

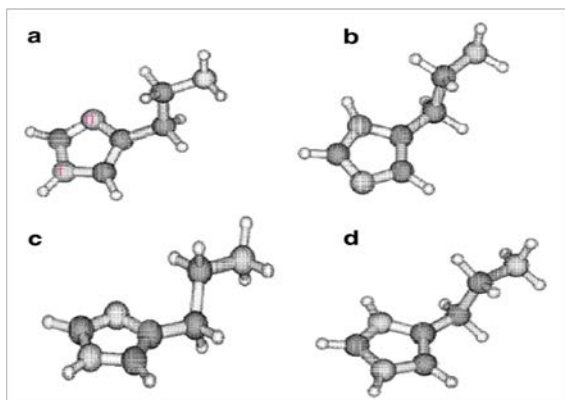


N τ -H oz. N³-H tautomerna oblika

N π -H oz. N¹-H tautomerna oblika

Slika 4: Tautomerni obliki histamina. Histamin obstaja v dveh tautomernih oblikah N³-H in N¹-H, ki sta pri fiziološkem pH v obliki monokationov (96 %) (prirejeno po 3).

Histamin ima dva bazična centra z vrednostima pK_a 5,8 (dušik v imidazolnem obroču) in 9,4 (alifatski primarni amin). Pri fiziološkem pH se nahaja v zmesi obeh tautomernih oblik, 96 % v obliki monokationa, okrog 3 % v obliki dikationa in preostalo v neprotonirani obliki (slika 5) (3).

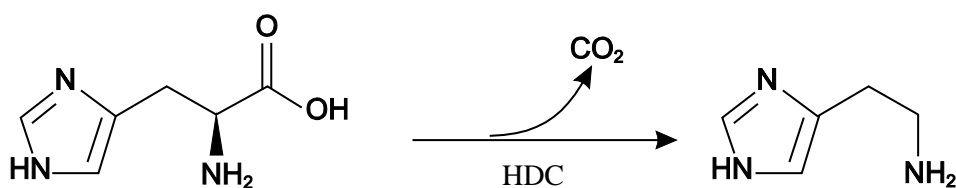


Slika 5: Strukture različnih tautomerov histamina.

- (a) nevtralni tautomer α ,
- (b) nevtralni π tautomer,
- (c) monoprotonirana oblika,
- (d) diprotonirana oblika (povzeto po 3).

Biosinteza histamina

Biosinteza histamina poteka z dekarboksilacijo aminokislina L-histidin, ki jo katalizira encim histidin-dekarboksilaza (HDC) (slika 6). Encim, ki za svojo aktivnost potrebuje koencim piridoksal-5-fosfat, prekine kovalentno vez med dvema ogljikoma in sprosti se ogljikov dioksid (1, 14). Encim histidin-dekarboksilaza je prisoten v Golgijevem aparatu v živčnih celicah, celicah želodčne sluznice, parietalnih celicah želodca, mastocitih in bazofilcih. Histamin nastaja v enterokromafinim podobnih celicah v želodcu, kjer igra pomembno vlogo pri izločanju želodčne kisline (5).



Slika 6: Biosinteza histamina. Dekarboksilacija histidina v histamin poteka pod vplivom histidin-dekarboksilaze (HDC), kot kofaktor sodeluje piridoksal-5'-fosfat.

Skladiščenje in sproščanje histamina

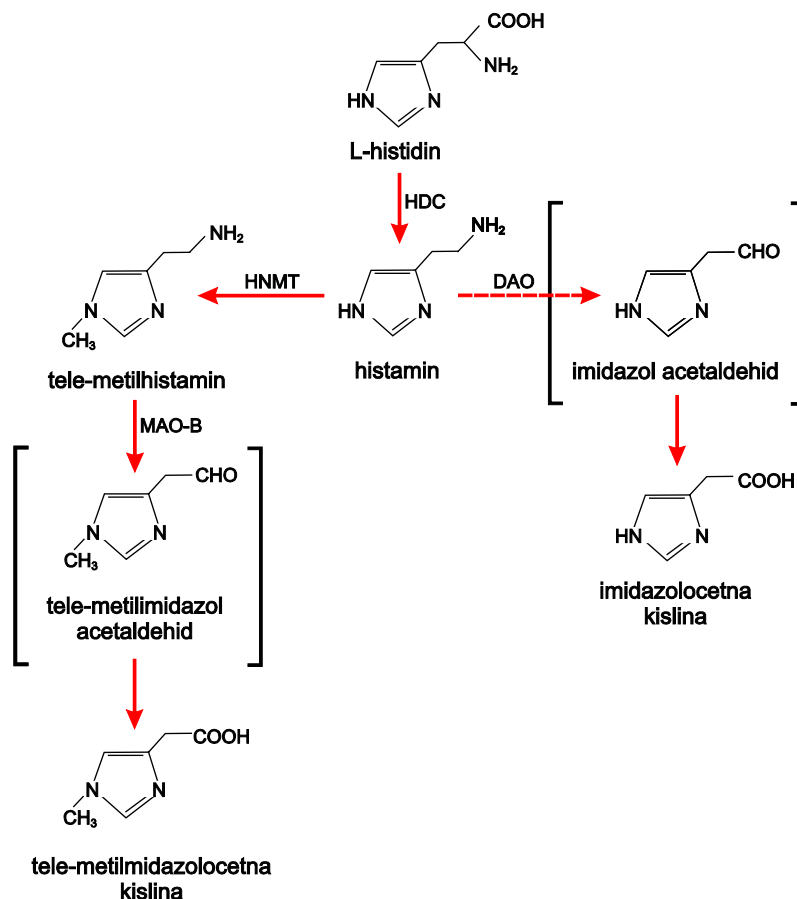
V mastocitih se histamin skladišči v sekretornih granulah v kompleksu s proteoglikanom heparinom, v bazofilcih pa v kompleksu s hondroitin sulfatom. Njegovo sproščanje lahko stimulirajo različni dražljaji, tako imunološki kot neimunološki (5).

Presnova histamina

Le zelo majhne količine sproščenega histamina (2 - 3 %) se izločijo nespremenjene. Preostanek histamina (več kot 97 %) se pred izločanjem presnovi preko dveh glavnih encimskih poti (slika 7) (5).

N-metiliranje poteka s pomočjo encima histamin-N-metiltransferaza (HNMT). Po tej poti se presnovi glavnina (50 - 80%) histamina do N-metil histamina, ki se nadalje pretvori s pomočjo encima monoamin oksidaze B do metilimidazolocetne kisline, ki se nato izloči z urinom.

Z oksidativnim deaminiranjem se presnovi 15-30 % histamina. S pomočjo encima diamino-oksidadza (DAO) pride do oksidativnega deaminiranja primarne amino skupine histamina z molekularnim kisikom in nastane aldehid, ki se nadalje oksidira do imidazolocetne kisline (5). Imidazolocetna kislina se v naslednji stopnji presnove konjugira z ribozo in se kot 1-ribozil-imidazol-4-ocetna kislina zaradi večje hidrofilnosti kot sama imidazolocetna kislina izloči z urinom (3).



Slika 7: Presnova histamina, ki poteka pri sesalcih

1.3. INTERAKCIJA RECEPTOR – LIGAND

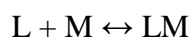
Za interakcijo med ligandom in receptorjem so pomembne različne vrste privlačnih sil oz. kemijskih vezi, ki se vzpostavijo v procesu vezave in se razlikujejo v energiji interakcije, dolžini trajanja (reverzibilnosti) in specifičnosti. Od tipa in jakosti kemijskih vezi je odvisna afiniteta med ligandom in receptorjem. Tipi vezi, ki so udeležene v interakcije receptor – ligand so (3):

1.3.1 Kovalentne interakcije

Kovalentna vez (200 - 560 kJ/mol) je najmočnejša vez, ki se pojavi pri interakcijah ligand-receptor. Nastane, ko atom molekule liganda in atom molekule receptorja prispevata vsak po en elektron v skupni elektronski par. Zaradi njene visoke jakosti je ligand običajno ireverzibilno vezan na receptor.

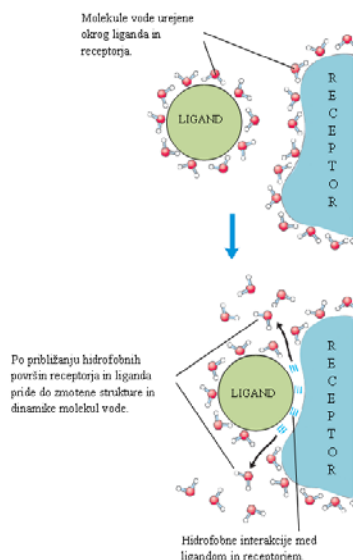
1.3.2 Nekovalentne interakcije

Nekovalentne molekulske interakcije na poseben način povezujejo dve različni molekuli ali različne dele iste molekule med seboj. Molekule lahko specifično prepoznavajo druge molekule in se z njimi povezujejo, kar imenujemo molekulsko prepoznavanje. Pri molekulskem prepoznavanju gre tipično za interakcije med ligandom in makromolekulo.



LM je kompleks s specifično biološko funkcijo, v katerem sta L in M povezana z nekovalentnimi vezmi (15). Nekovalentne interakcije so šibke, tako da se kompleks zlahka ustvari in razcepi.

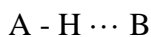
Tipi nekovalentnih interakcij so: ionska vez (20 – 40 kJ/mol), hidrofobne interakcije (2-5 kJ/mol) (slika 8) in vodikova vez (8-125 kcal/mol). Hidrofobna interakcija je v glavnem posledica interakcije med molekulami vode in ima praviloma močno entropijsko komponento, ki se mikroskopsko odraža v upočasnjeni dinamiki molekul vode.



Slika 8: Shematski prikaz hidrofobne interakcije med ligandom in receptorjem (prirejeno po 16).

Vodikova vez (8 - 125 kcal/mol) je šibka kemijska vez elektrostatske narave, ki nastane med elektronegativnim atomom (akceptorjem vodika, najpogosteje kisikom oziroma dušikom, fluorom ali žveplom z neveznim elektronskim parom) in vodikovim atomom, ki je kovalentno vezan na drug elektronegativen atom (elektron donor), v isti ali pa drugi molekuli. Vodikovi atomi kovalentno vezani na ogljikove atome pri tvorbi vodikovih vezi ne sodelujejo, saj je ogljik le rahlo bolj elektronegativen kot vodik. Vodikova vez je usmerjena in določa strukturo proteinov, nukleinskih kislin ter prepoznavanje ligand – receptor (16).

Shematsko jo ponazorimo kot interakcijo med vodikom, vezanim na donorski atom A, in akceptorskim atomom B:



A in B sta najpogosteje močno elektronegativna elementa (O, N, F, S); akceptor vodikove vezi je lahko tudi π -elektronski sistem. Po geometrijski definiciji je v sistemu A - H \cdots B vodikova vez prisotna tedaj, ko je razdalja A \cdots B manjša od vsote van der Waalsovih radijev izoliranih atomov A in B (3, 17, 18).

1.4 VODA

Voda je glavna sestavina fiziološke tekočine (18) in lahko vpliva na lastnosti ligandov ter na vezavo ligandov na vezavna mesta.

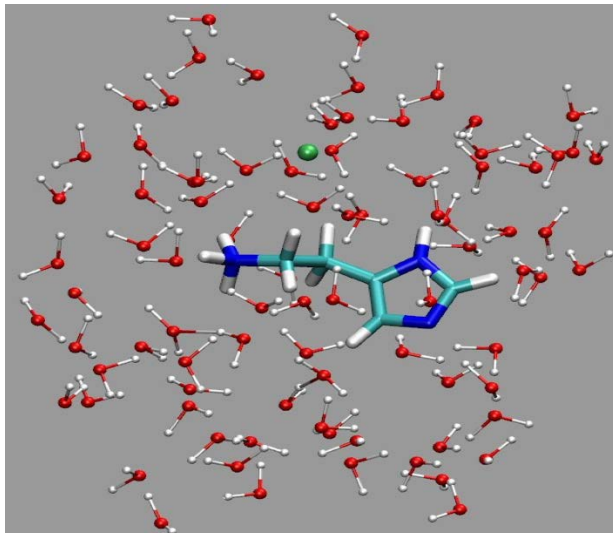
1.4.1 Struktura vode

Molekula vode je električno nevtralna (nima neto naboja), vendar ima zaradi svoje geometrije relativno velik dipolni moment. Kot med vodikovima atomoma vezanima na kisikov atom v molekuli vode je 104,5°, OH razdalja pa 0,97 Å. Voda ima višjo temperaturo tališča, vrelišča in višjo izparilno ter specifično toploto kot večina podobnih topil (16, 19). Te lastnosti je mogoče pojasniti s predpostavko, da se molekule vode povezujejo v večje agregate, tj. v polimerne tvorbe (H₂O)_x v bioloških in nebioloških sistemih. Vodikova vez je najbolj pomembna interakcija za strukturo in stabilnost vode. Centralna molekula vode se lahko poveže s sosednjimi molekulami vode z največ štirimi vodikovimi vezmi, toda v povprečju se pri sobni temperaturi s tremi. Mrežna struktura se konstantno spreminja, saj se molekule vode geometrijsko prerazporedijo in vstopajo v nove vodikove vezi z drugimi sosednjimi molekulami vode (15). Voda je torej tipičen primer tekočine, v kateri so molekule povezane z vodikovo vezjo. Efektivni naboj na kisikovem atomu je -0,82 au, na vodikovem atomu pa 0,41 au. V tekoči vodi sta kisikova atoma udeležena v vodikovi vezi s tipično razdaljo 3Å (16, 18, 19).

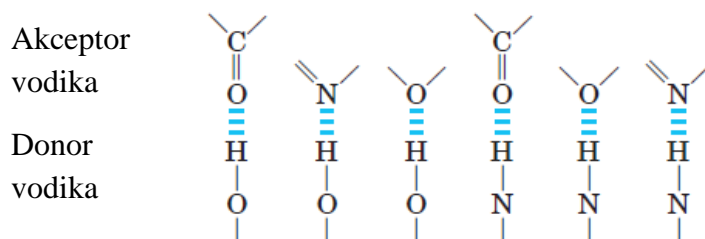
1.4.2 Tvorba vodikovih vezi med vodo in polarnimi topljenci v organizmu

Voda ima izjemno lastnost, da raztaplja številne biološke molekule (slika 9), ki jih najdemo v živih organizmih. Polarne (ionske in nenabite) snovi so dobro topne v vodi. Prav tako se v vodi topi tudi veliko nenabitih bioloških molekul, ker imajo polarne funkcionalne skupine, ki lahko vstopajo v ugodne dipol-dipol interakcije (slika 10). Gosta mreža vodikovih vezi nastane, ko se atomi polarne funkcionalne skupine povezujejo z molekulami vode. Ionske spojine so topne v vodi, ker se posamezni ioni hidratirajo s polarnimi molekulami vode. Negativni del dipola (kisikov atom) v molekuli vode omogoča interakcijo dipol-ion s pozitivno nabitim ionom topljenca. Tudi pri negativno nabitih anionih pride do tvorbe dipol-ion interakcij z molekulami vode. V tem primeru se vzpostavi interakcija med pozitivnim dipolom (vodikov atom) molekule vode in negativnim nabojem na anionu. Privlak med večino ionov in polarnimi molekulami vode je dovolj močan, da prepreči ponovno združitev anionov s kationi. Tudi makromolekule,

vključno s proteini in nukleinskimi kislinami, so pri *in vivo* razmerah v obliki hidratiranih ionov, saj se v vodni raztopini zvičejo v konformacije, pri katerih se hidrofobni deli molekul pomaknejo v notranjost molekule in se tako izognejo stiku z vodo, ionske in polarne funkcionalne skupine pa se izpostavijo vodi (15).



Slika 9: Primer hidratacije histamina pri fiziološkem pH. Ob dodatku molekul topljenca se mrežna struktura vode poruši. Prav tako se zaradi vode spremeni tudi struktura biomolekul (povzeto po 10, 15).



Slika 10: Tipične vodikove vezi v bioloških sistemih. Akceptorja vodika sta običajno kisik in dušik, donor vodika pa je drug elektronegativen atom (povzeto po 16).

1.5 DEVTERIRANJE

Večina elementov sestoji iz različnih atomov, ki imajo isto število protonov oziroma elektronov (kar pomeni isti element), a različno število nevtronov. Govorimo o izotopih. Pri vodiku so znani trije izotopi z masnimi števili 1, 2 in 3. ¹H (vodik), ²H (devterij, uporabljamo tudi simbol D) in ³H (tricij, simbol T) (19). Devteriranje je proces, pri

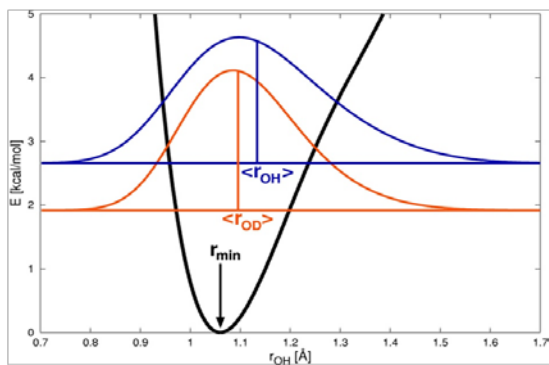
katerem se ¹H vodikovi atomi vezani na elektronegativne atome izmenjajo z atomi devterija. Pri proteinih proces devteriranja steče že, če proteine inkubiramo v devterirani vodi (D₂O). Vodikova vez ima velik vpliv na strukturo in lastnosti molekule vode in je tip interakcije, ki ima ključno vlogo pri vezavi liganda na receptor. Zaradi udeležbe lahkega vodikovega atoma v vodikovi vezi ima taka interakcija znaten nuklearni kvantni karakter in potrebuje kvantno obravnavo gibanja vodikovega jedra, ki je odvisno od njegove mase. Na splošno velja, da se težji atomi manj gibljejo kot lažji. Če torej proton, ki ima maso 1 amu, zamenjamo z devteronom, ki ima maso 2 amu, zmanjšamo razdaljo med donorjem protona in protonom, ker ima valovna funkcija za devterij manjšo amplitudo gibanja kot proton (slika 11). Poveča se razdalja med donorjem in akceptorjem protona in posledično se podaljša dolžina vodikove vezi, njena jakost pa se zmanjša. Pojav imenujemo Ubbelohdejev efekt (slika 12) (17, 20).

Z devteriranjem vplivamo na strukturo in stabilnost bioloških makromolekul in njihovih ligandov. Ker pride zaradi zamenjave vodika z devterijem do spremembe afinitete vezave devteriranega liganda na devteriran receptor in posledično do spremembe funkcijske sposobnosti receptorja, je devteriranje uporabna metoda za preučevanje mehanizma vezave liganda na receptor in/ali aktivacije receptorja ter študija vpliva vodikov vezi na te procese.



Slika 11: Shematska ponazoritev sprememb razdalj v vodikovi vezi po devteriranju.

Vez med dušikom in devterijem je v povprečju krajša za 2,3 % glede na vez med dušikom in vodikom, medtem ko se razdalja med devterijem in kisikom, ki je pomembna za stabilizacijo vezi, podaljša. Zato se energija vezi zmanjša, kompleksi s takšnimi vezmi pa so manj stabilni (21).



Slika 12: Ubbelohdejev efekt. Odvisnot energije kemijske vezi od razdalje med atomoma kisika in vodika ter atomoma kisika in devterija.

Zaradi nižje energije ničelne točke pri O-D, se vodikova vez po devteriranju podaljša. Vez O-D je zaradi nižje energije ničelne točke tudi bolj stabilna (20). Energija ničelne točke ali energija vakuuma (angl. zero-point energy) je posledica kvantnih fluktuacij elektromagnetnega polja v vakuumu, kadar so le-te omejene na končno območje z določenimi robnimi pogoji (22).

1.6 RAČUNSKA KEMIJA

Razvoj računske oziroma računalniške kemije je povezan z uporabo kvantne mehanike in molekulske mehanike pri reševanju kemijskih problemov in napredkom računalniške tehnologije. Služi kot dopolnilo eksperimentalnemu delu (23).

1.6.1 Modeli atomov, molekul in molekulska grafika

Molekulsko modeliranje se začne z izgradnjo tridimenzionalnega molekulskega modela – atomistične predstavitve strukture obravnavane molekule. Poleg ročne izgradnje molekulskega modela v za to namenjenih programih lahko začetne koordinate tridimenzionalnega molekulskega modela pridobimo tudi z uporabo eksperimentalnih podatkov, ki so največkrat rezultati analize z rentgensko difrakcijo ali pa jedrsko magnetno resonanco (NMR).

Dostopnih je veliko računalniških programov, ki omogočajo gradnjo in/ali prikaz molekulskih modelov (23).

1.6.2 Preiskovanje površine potencialne energije atomov in molekul - geometrijska optimizacija – energijska minimizacija

Začetni tridimenzionalni model molekule, zgrajen z grafičnim programom, je pogosto v neugodni konformaciji, ki ima visoko vrednost potencialne energije in ne predstavlja karakteristične konformacije molekule. Večdimenzionalno površino, ki ponazarja energijo molekule kot funkcijo vseh možnih razporeditev (koordinat njenih atomov), imenujemo površina potencialne energije (angl. potential energy surface – PES). Na njej želimo poiskati predvsem stacionarne točke, tako imenovane minimume (lokalne in globalnega), kjer je molekula v ugodnih energijskih legah, kot tudi sedla, ki predstavljajo lokacijo geometrij prehodnih stanj (23).

Geometrijska optimizacija je računski postopek iskanja konformacij molekul v energijskih minimumih (ali sedlih) na površini potencialne energije.

1.6.3 Opis atomov in molekul – molekulska mehanika (MM)

Molekulska mehanika je rezultat poenostavitve obnašanja atomov in molekul, ki temelji na predpostavki, da lahko atome opišemo kot nabite kroglice ustreznih mas, ki so med seboj

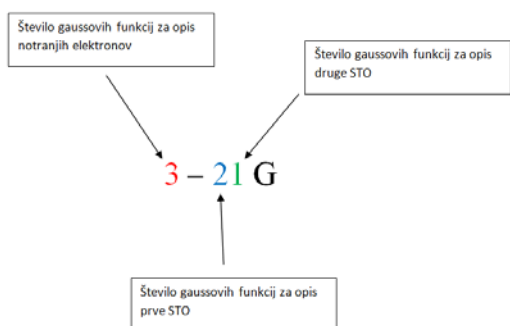
povezani s kovalentnimi vezmi. Opredeljena je kot teoretični opis atomov in molekul, ki omogoča računsko obravnavo strukture in lastnosti atomov in molekul po metodah klasične mehanike in elektrostatike (23).

1.6.4 Kvantnomehanski pristopi (QM)

Poleg opisa atomov in molekul, ki ga ponuja molekulska mehanika, lahko atomsko strukturo obravnavamo tudi drugače. To je predvsem pomembno, kadar želimo preučevati lastnosti, ki jih z molekulsko mehaniko ne moremo zadovoljivo opisati, na primer tvorbe in razcepi kovalentnih vezi, ki se zgodijo pri kemijski reakciji. Tu iz empiričnega opisa preidemo v natančnejši fizikalni opis atomov in molekul. Fizikalno osnovo za računanje molekulske strukture in energije podaja Schrödingerjeva enačba, ki obravnava molekule kot zbirko jeder in elektronov brez predhodnega vedenja o kemijski vezi.

Kadar strukturo in energijo molekule obravnavamo z reševanjem Schrödingerjeve enačbe govorimo o *ab initio* (lat. iz prvih principov) računih. Pri teh računih ne uporabljamo predhodnih eksperimentalnih podatkov in parametrov, ampak je pomemben le nabor atomov (število protonov in elektronov) v molekuli. Čas računanja se drastično podaljšuje z večanjem števila obravnavanih delcev. Trenutno lahko s kvantno mehaniko, v sprejemljivih računskih časih, obravnavamo molekule z nekaj 100 atomi, saj se čas računanja eksponentno povečuje z večanjem števila obravnavanih delcev. Princip računanja je variacijski, uporabimo lahko različne bazne funkcije (orbitale). Imamo Slaterjeve (STO) in in Gaussove (GTO) orbitale.

Minimalni bazni set STO-NG (N predstavlja število Gaussovih funkcij, ki opiše eno STO) je bazni set, ki opiše le najosnovnejše aspekte orbitale. Slaterjeve orbitale (STO) so matematično okorne za učinkovito reševanje Schrödingerjeve enačbe. Zato vsako Slaterjevo orbitalo aproksimiramo s produktom Gaussovih orbital, ki so matematično bolj fleksibilne (23, 24).



Slika 13: Oznake baznega seta (prirejeno po 23, 24).

2. NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE

Modeliranje majhnih, preprostih sistemov z vodikovimi vezmi je pomembno za osnovno razumevanje vodikove vezi in njene kompleksnosti ter je bistveni pogoj za proučevanje dinamike vodikove vezi v okolju fluktuirajočih polarnih makromolekul kot so receptorji.

Vodikova vez ima pomembno vlogo pri vezavi ligandov na receptor. V procesu devteriranja pride do izmenjave vodika z njegovim izotopom devterijem, ki je dvakrat težji. Glavni vzrok za spremenjeno vezavo devteriranega histamina, v primerjavi z nedeuteriranim, je sprememba v elektrostatski interakciji med receptorjem in histaminom. Ta sprememba je posledica krajše razdalje med atomom dušika in devterijem v devteriranem histaminu, zaradi česar se zmanjša elektrostatska interakcija med aspartatom in histaminom. Devteriranje pa vpliva tudi na molekule vode, saj se z devterijem izmenjajo tudi atomi vodika iz molekul vode.

Pri izračunih spremembe proste energije vezave histamina na histaminski receptor H₂, moramo pri izračunih upoštevati tako vpliv devteriranja na sistem histamin – receptor, kot tudi na molekule vode, ki so z vodikovimi vezmi povezane z molekulo histamina.

V diplomskem delu smo preverili naslednje tri hipoteze:

1. Vrednost proste energije hidratacije histamina bo v devterirani vodi bo zaradi skrajšanja vezi N-D in O-D in posledično podaljšanja vodikovih vezi, udeleženih v tvorbo kompleksa histamin – molekule vode, višja kot v primeru vode.
2. Vrednost proste energije interakcije histamina z vezavnim mestom histaminskega receptorja H₂ bo v sistemu z devterijem, zaradi skrajšanja vezi N-D in O-D višja kot v sistemu z vodikom.
3. Devterirani histamin bo imel drugačno afiniteto do receptorja kot nedeuterirani histamin, saj na spremembo afinitete liganda do receptorja pri devteriranju vplivata dva prispevka, ki se odštevata. Zmanjšata se prosta energija vezave in prosta energija hidratacije. Glede na to, katera komponenta prevlada, se afiniteta liganda do receptorja pri devteriranju lahko poveča ali zmanjša.

3. METODE IN OPREMA

Računske metode kvantne kemije predstavljajo izredno zahtevne izračune, zato pri delu uporabljamo zmogljive večprocesorske računalnike (preglednica II) in primerno programsko opremo (preglednica III). Pri delu smo večinoma uporabljali gručo računalnikov na Kemijskem inštitutu.

3.1 Strojna oprema

Preglednica II: Uporabljena strojna oprema. Gruča računalnikov je sestavljena iz:

OPREMA	SPECIFIKACIJE
Procesor	2 x Intel Xeon E5420
Frekvenca procesorja	2,5 GHz
Število jeder procesorja	4
Kapaciteta predpomnilnika procesorja	12 MB
Pomnilnik	8 GB
Trdi disk	1 TB

3.2 Programska oprema

Preglednica III: Uporabljena programska oprema.

OPREMA	SPECIFIKACIJE
Molden verzija	v4.8
Gaussian verzija	g09

4. POSTOPEK DELA

Za konstrukcijo tridimenzionalnih struktur, ki smo jih potrebovali pri našem računanju, smo uporabljali program za vizualizacijo molekulske in elektronske strukture Molden. Program Molden nam za obravnavano strukturo izpiše interne koordinate atomov v Z-matriki, kar je pomembno za kasnejši prenos podatkov v program Gaussian09.

Z-matriko, ki smo jo dobili s pomočjo programa Molden, smo izvozili v enostaven urejevalnik besedila ter jo opremili tako, kot zahteva optimizacijski program Gaussian09 (slika 14).

Na začetku vhodne datoteke za Gaussian09 smo navedli podatke o tem, kam naj program shranjuje začasne podatke (angl. checkpoint file), kolikšno količino systemskega pomnilnika ima na voljo in koliko procesorskih jeder naj uporabi. Nato je sledila ukazna vrstica oziroma specifikacija izračuna. V njej smo določili nivo teorije, bazni set ter vrsto izračunov, ki naj jih program opravi. Z odstavkom smo ločili naslednjo vrstico, v katero smo vpisali naš komentar. Po novem odstavku smo določili še naboj celotnega sistema in multipliciteto. Tej vrstici je sledila Z-matrika, ki določa konfiguracijo atomov v prostoru.

```
%mem=1GB
%nproc=1
#p M062X/6-31+G(d,p) OPT=(Maxcycle=200,Z-matrix) SCF=(Tight,Maxcycle=200)
#p FREQ=NoRaman SCRF=(CPCM,Read)

Geometrijska optimizacija H-histamina v povezavi s petimi molekulami vode

1 1
c
n 1 nc2
c 2 cn3    1 cnc3
c 3 cc4    2 ccn4    1 dih4
n 4 nc5    3 ncc5    2 dih5
c 3 cc6    2 ccn6    1 dih6
c 6 cc7    3 ccc7    2 dih7
n 7 nc8    6 ncc8    3 dih8
o 2 on9    3 onc9    4 dih9a
```

Slika 14: Glava vhodne datoteke za program Gaussian09 za enega od izračunov pri računanju proste energije hidratacije.

Gaussian09 je program za kvantno kemijo, ki omogoča *ab initio* računanje različnih kvantnokemijskih izračunov. S programom Gaussian09 smo izvedli geometrijsko optimizacijo posameznih tridimenzionalnih struktur.

4.1 IZRAČUN PROSTE ENERGIJE HIDRATACIJE

4.1.1 Priprava vhodnih datotek

S pomočjo programa Molden smo zasnovali tridimenzionalne strukture histamina v plinski fazi, petih molekul vode povezanih v pentamer, dimera vode in histamina v interakciji s petimi molekulami vode. Dobljene Z-matrike posameznih struktur smo nato dopolnili tako, da smo jih lahko uporabili za geometrijsko optimizacijo.

4.1.2 Geometrijska optimizacija za vodik

Program Gaussian09 smo pognali z urejenimi vhodnimi datotekami. Popolno geometrijsko optimizacijo smo izvedli za vsak posamezni del uporabljene sheme (histamin v plinski fazi, pet molekul vode povezanih v pentamer, dimer vode in histamin v interakciji s petimi molekulami vode), na nivoju teorije M06-2X z baznim setom 6-31+G(d). Uporabljeni bazni set sodi med razširjene bazne sete, njegove oznake pa pomenijo, da smo pri izračunih uporabili šest Gaussovih orbital za popis notranjih orbital elementa, zunanje pa smo popisali z eno oziroma tremi Gaussovimi orbitalami, na težke atome (C, N, O) pa so bile dodane še polarizacijske funkcije.

4.1.3 Geometrijska optimizacija za devterij

Dolžine vezi N-H in O-H, ki smo jih dobili pri popolni geometrijski optimizaciji v sistemu z vodikom, smo skrajšali za 2,3 % in jih zamrznili. Ponovno smo izvedli popolno geometrijsko optimizacijo za vsako posamezno strukturo na nivoju teorije M06-2X z baznim setom 6-31+G(d). Vrednost 2,3 % smo uporabili na podlagi nevtronske difrakcijske analize kristalov alanina, ki jo je izvedla Bordallo s sodelavci (21), in v kateri so ugotovili, da je dolžina vezi N-D za 2,3 % krajša glede na vez N-H. Pri tem smo predpostavili, da je skrajšanje vezi N-H pri devteriranju histamina enako kot v kristalu

aminokislina alanina. Predpostavka temelji na primerljivih učinkih kristalnega polja in vodne raztopine in je privzeta z razvojem polja sil za proteine.

Pri vseh izračunih za vodno okolje smo upoštevali dielektrično konstanto $\epsilon = 78,0$ (slika 15). Le-to v programu Gaussian09 določimo tako, da na koncu vhodne datoteke po prostem odstavku navedemo vrednost dielektrične konstante za katero želimo, da jo program upošteva pri izračunu. Če dielektrične konstante ne navedemo, program Gaussian09 izvede izračune za vakuum in uporabi dielektrično konstanto $\epsilon = 1,0$.

```
hc48    1.094565
hcc49   109.736
dih49   120.128
hc50    1.094347
hcc50   110.519
dih50   239.786

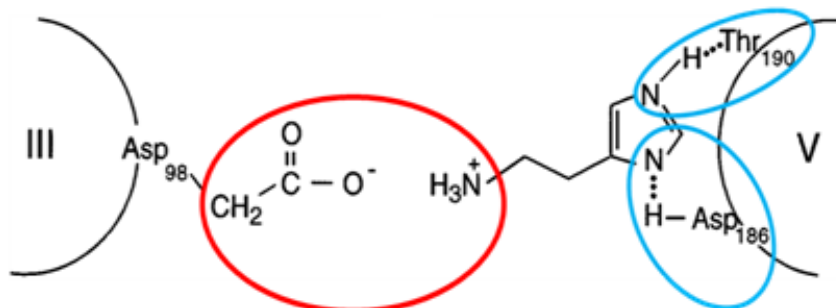
eps=78.0
```

Slika 15: Zaključek vhodne datoteke za program Gaussian09, v primeru, da želimo definirati dielektrično konstanto okolja

4.2 IZRAČUN PROSTE ENERGIJE INTERAKCIJE HISTAMIN – HISTAMINSKI RECEPTOR H₂

Ker je sistem histamin – histaminski receptor H₂ prevelik, da bi lahko celotnega obravnavali na kvantno-kemijskem nivoju, smo najprej s pomočjo literature določili aminokislinske ostanke, ki smo jih uporabili pri računanju. Ker eksperimentalna struktura receptorja H₂ še ni poznana, smo za izračune izbrali tri aminokislinske ostanke, aspartat na mestu 98 (Asp98), treonin na mestu 190 (Thr190) in aspartat na mestu 186 (Asp 186), za katere so na podlagi ugotovitev predhodnih raziskav usmerjene mutageneze, ki jih je

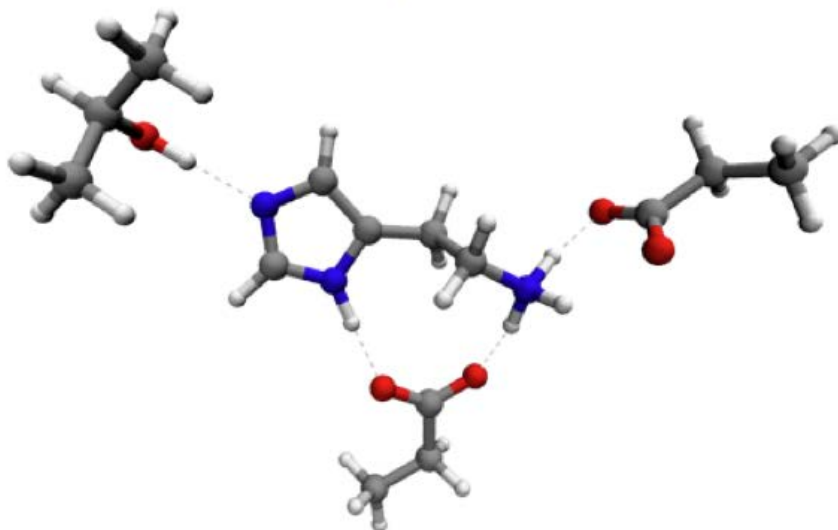
izvedel Birdsall s sodelavci (25), in jih je povzel Gantz s sodelavci (10), ugotovili, da sodelujejo pri vezavi histamina na histaminski receptor H₂.



Slika 16: Teoretični model vezave histamina na histaminski receptor H₂ (Prirejeno po 10).

4.2.1 Priprava vhodnih datotek

V programu Molden smo izdelali 3D strukturo histamina v interakciji z aminokislinskimi ostanki Asp98, Thr190, Asp 186 histaminskega receptorja H₂ (slika 16). Izbranih aminokislinskih ostankov nismo skonstruirali v celoti, ampak do α -C atomov posameznih aminokislinskih ostankov (slika 17). Pri obeh aspartatnih ostankih smo upoštevali naboj -1 (-COO⁻). Za histamin pa smo izbrali najbolj stabilno tautomerno obliko monoprotoniranega histamina (-NH₃⁺), ³H-imidazolni tautomer, ker le-ta tvori močnejše vodikove vezi z Asp186 in Thr190 histaminskega receptorja H₂. Takšne prilagoditve omogočajo tvorbo solnega mostička med amino skupino histamina in karboksilno skupino Asp98 histaminskega receptorja H₂. Celotni sistem histamin – vezavno mesto histaminskega receptorja H₂ je imel naboj -1.



Slika 17: Model histamina v interakciji z aminokislinskimi ostanki Asp98, Asp 186 in Thr190 histaminskega receptorja H₂, ki smo jih skonstruirani do α -C atoma.

4.2.2 Geometrijska optimizacija

Po ureditvi glave vhodne datoteke za program Gaussian09 smo izvedli geometrijski optimizaciji na nivoju teorije M06-2X/6-31+G(d,p). Pri izračunih smo upoštevali učinke topila s pomočjo Tomasijevega reakcijskega polja topila (CPCM) (11), ter upoštevati dielektrično konstanto za notranje proteinsko okolje $\epsilon = 4,0$ (26).

Za nedeuteriran sistem histamin – vezavno mesto histaminskega receptorja H₂ smo izvedli popolno geometrijsko optimizacijo. Za devteriran sistem histamin – vezavno mesto histaminskega receptorja H₂, pa smo na podlagi rezultatov analize, ki jo je izvedla Bordallo s sodelavci (21), skrajšali dolžine vezi N-H in O-H, ki smo jih dobili pri popolni geometrijski optimizaciji v sistemu z vodikom, za 2,3 % in jih zamrznili, ter nato izvedli geometrijsko optimizacijo.

4.3 IZRAČUN CELOKUPNE SPREMEMBE VEZAVNE PROSTE ENERGIJE HISTAMINA PO DEVTERIRANJU

Celokupno spremembo proste energije vezave histamina na histaminski receptor H₂ po devteriranju smo izračunali po naslednji enačbi:

$$\Delta G^{\text{VEZAVNA}}_{\text{H} \rightarrow \text{D}} = \Delta G^{\text{INTER.}}_{\text{H} \rightarrow \text{D}} - \Delta G^{\text{HIDRAT.}}_{\text{H} \rightarrow \text{D}}$$

Zaradi molekul vode, ki so prisotne v okolici histamina, je potrebno od spremembe proste energije interakcije odšteti spremembo proste energije solvatacije histamina.

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

S proteinom G sklopljeni receptorji predstavljajo najboljše družino receptorjev, v katero uvrščamo okrog 800 membranskih proteinov, ki naj bi predstavljali med 30 in 50 % vseh tarč zdravil na trgu. Zaradi razširjenosti te skupine receptorjev po celem telesu in vpletenosti v mnoga bolezenska stanja, ki jih zaenkrat še ne znamo uspešno zdraviti (alzheimerjeva in parkinsonova bolezen), jim raziskovalci namenjajo veliko pozornosti. Njihovo pomembnost dokazuje tudi Nobelova nagrada za kemijo za leto 2012, ki je bila podeljena Robertu J. Lefkowitzu and Brianu K. Kobilki za raziskave s proteinom G sklopljenih receptorjev (GPCR) in sicer za prispevek na področju določitve strukture (prva kristalna struktura adrenergičnih receptorjev β) in delovanja GPCRs (signaliziranje, časovno omejeno delovanje, ki je posledica sprememb v signalizaciji, internalizacija receptorjev) (27).

Bistvo s proteinom G sklopljenih receptorjev je, da zaznajo majhne spremembe (signal, vezavo nizkih koncentracij ligandov) na zunajcelični strani. Po vezavi liganda na vezavno mesto na receptorju, se receptor konformacijsko spremeni in pride do aktivacije kaskade znotrajceličnih signalnih poti, ki vključujejo kemijsko reakcijo in sintezo sekundarnega sporočevalca. Končna posledica je fiziološki odziv celice (27). Aktivacija te vrste receptorjev je zapleten proces, ki vključuje konformacijske spremembe receptorja, zato poleg nepoznavanja terciarnih struktur večine s proteinom G sklopljenih proteinov, predstavlja dodaten problem pri odkrivanju mehanizma aktivacije membranskih receptorjev tudi nepoznavanje strukture aktivirane in neaktivirane oblike receptorja. Relativni stabilnosti aktivirane in neaktivirane konformacije receptorja z vezanim ligandom sta odgovorni za ločevanje med agonisti in antagonisti. Če receptor podvržemo kemijski spremembi, npr. devteriranju, pride do spremembe tega ravnotežja. Nadaljnje raziskave teh sprememb na molekularnem nivoju bi lahko predstavljale pomemben korak naprej pri razumevanju konformacijskih sprememb s proteinom G sklopljenih receptorjev, saj bo podrobnosti molekularnega mehanizma vezave liganda na receptor in mehanizma aktivacije receptorja zelo težko določiti eksperimentalno, tudi po tem, ko bodo poznane terciarne strukture s proteinom G sklopljenih receptorjev.

V naši raziskavi smo se osredotočili na s proteinom G sklopljen receptor. Za model smo izbrali histaminski receptor H₂, ker je njegova primarna struktura poznana, vendar pa še ni znana rentgenska (kristalna) struktura, ker raziskovalcem zaenkrat še ni uspelo kristalizirati histaminskega receptorja H₂. Kristalizacija membranskih beljakovin je zahteven proces, ker proces zahteva prenos delov proteina, ki so bili prej v stiku s hidrofobno okolico membrane v polarno makromolekularno okolje. Ker tak proces ni termodinamsko ugoden, si raziskovalci pomagajo z uporabo različnih površinsko aktivnih snovi (detergentov). Kristalne strukture receptorjev so praviloma nizke ločljivosti in v nobeni od njih niso razvidni detajli vodikovih vezi v vezavnem mestu.

Za vezavo histamina na histaminski receptor H₂ je ključna vodikova vez. Z metodami računske kemije smo preučevali vpliv devteriranja na vodikove vezi, udeležene v interakciji histamin – vezavno mesto na histaminskem receptorju H₂ in interakcijo histamin – voda. Z devteriranjem namreč vplivamo na vodikove vezi, ki se tvorijo v interakcijah:

- histamin – receptor
- histamin – voda
- receptor – voda
- voda – voda.

Prispevka prvih dveh sistemov sta najbolj pomembna za celokupno spremembo vezavne proste energije histamina na histaminski receptor H₂, po devteriranju, zato smo se pri izračunih osredotočili le nanju.

Do vezavnega mesta na receptorju lahko poleg molekule liganda dostopajo tudi molekule vode. Prav tako so molekule vode razvrščene okrog ligandov. Če je molekula D₂O v bližini aminokislinskega ostanka, na katerem se nahajajo vodiki, vezani na elektronegativne atome, se le-ti vodiki zelo hitro izmenjajo z devterijem. Zaradi spremenjenega medmolekulskega potenciala, lahko predpostavimo spremenjen entropijski prispevek k prosti energiji vezave. Entropijski prispevek med zvrstmi z vodikom in devterijem se naj ne bi znatno spreminjal, saj je perturbacija majhna (28).

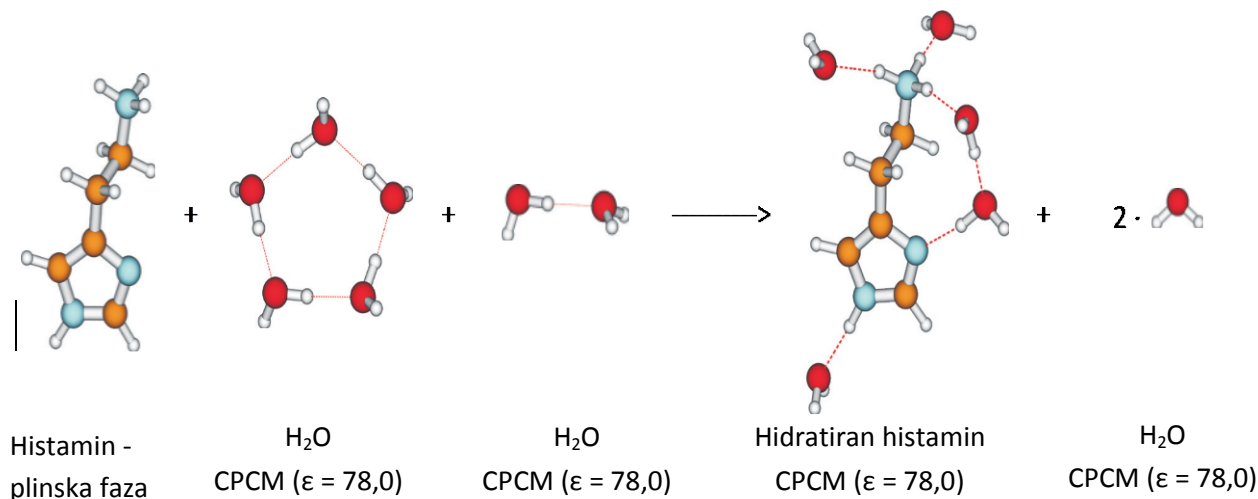
Če želimo natančno izračunati vezavno afiniteto histamina na receptor H₂, moramo upoštevati dejstvo, da je po vezavi histamina na receptor, kompleks histamin – vezavno mesto histaminskega receptorja H₂, pogreznjen v protein. Histamin torej preide iz

polarnega vodnega okolja v manj polarno okolje znotraj proteina. Zato smo pri izračunih upoštevali dve različni dielektrični konstanti. Za dielektrično konstanto notranjega proteinskega okolja smo izbrali dielektrično konstanto $\epsilon = 4,0$, kot jo predlaga Himo s sodelavci (26). Za vodno okolje pa smo upoštevali dielektrično konstanto $\epsilon = 78,0$.

5.1 HISTAMIN V VODNEM OKOLJU

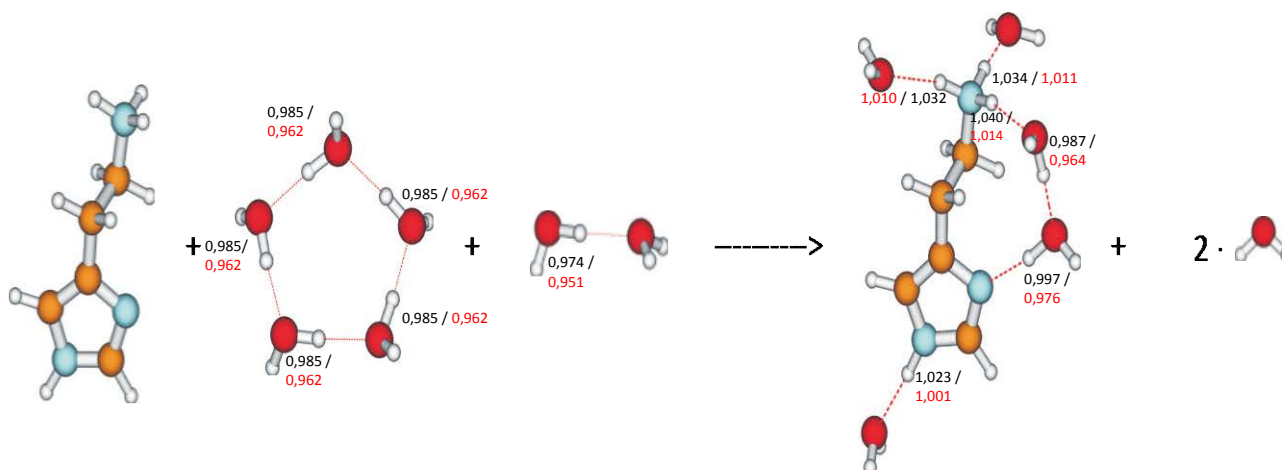
Glede na rezultate Vianella in Mavrija (29) smo za izračun proste energije hidratacije (ΔG_{HYDR}) histamina zasnovali naslednjo shemo (slika 18), ki naj bi predstavljala najustreznejši način za izračun proste energije hidratacije.

Na levi strani sheme smo imeli pet molekul vode, z vodikovimi vezmi povezanih v pentamer in dve molekuli vode povezani med seboj z eno vodikovo vezjo. Na desni strani sheme se je pet molekul vode razporedilo okoli histamina, dve molekuli vode pa sta ostali prosti. Število vodikovih vezi je tako na obeh straneh sheme ostalo enako.



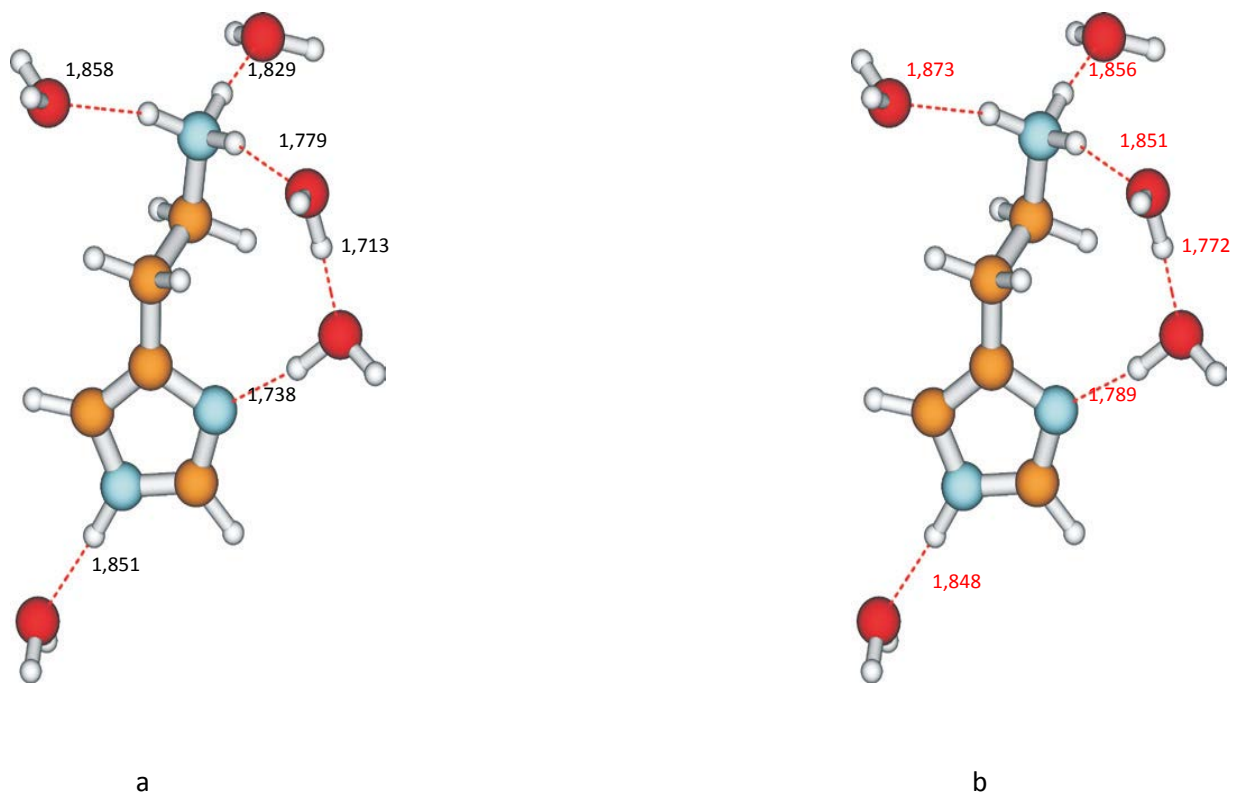
Slika 18: Uporabljena shema za izračun proste energije hidratacije.

Po geometrijski optimizaciji smo vezi N-H in O-H, ki so udeležene v tvorbo vodikovih vezi, skrajšali za 2,3 % in dobljene dolžine zamrznili (slika 19). To pomeni, da se te dolžine pri ponovnem zagonu geometrijske optimizacije za devteriran histamin in devterirane molekule vode niso spreminjale.



Slika 19: Dolžine vezi O-H in N-H pred in po devteriranju. Vrednosti označene s črno barvo predstavljajo dolžine vezi N-H in O-H, ki smo jih dobili s popolno geometrijsko optimizacijo nedeuteriranih sistemov. Vrednosti označene z rdečo barvo pa predstavljajo za 2,3 % skrajšane dolžine. Vodiki so na shemi predstavljeni z belimi kroglicami, atomi dušika z modrimi in atomi kisika z rdečimi.

Zaradi Ubbelohdejevega efekta je zaradi skrajšanja vezi med donorjem vodika (N oziroma O) in vodikom, prišlo do podaljšanja razdalj med donorjem vodika (N oziroma O) in akceptorjem vodika (O oziroma N). Posledično je prišlo do podaljšanja vodikovih vezi med devteriranim histaminom in devteriranimi molekulami vode (slika 20).



Slika 20: Dolžine vodikovih vezi v sistemu histamin-voda (a) pred in (b) po devteriranju.

Zaradi podaljšanja vodikovih vezi med molekulo histamina in molekulami vode, ki so nastale kot posledica devteriranja, se je spremenila jakost vodikovih vezi in prosta energija hidratacije. Prosta energija hidratacije je reverzibilno delo za prenos topljenca iz vodne raztopine v plinsko fazo. Ker je histamin nabita molekula, je prosta energija hidratacije histamina zelo ugodna, saj znaša za red velikosti več kot je vrednost proste energije hidratacije snovi, ki je električno nevtralna. Prosta energija hidratacije je odvisna tudi od kontaktne razdalje voda-topljenec. Čim krajša je razdalja voda topljenec, bolj ugodna je prosta energija hidratacije. Pri naših izračunih smo uporabili pristop supermolekul. Z upoštevanjem skupka histamin in posameznih molekul vode (model eksplicitnega topila) smo supermolekulo obravnavali na elektronskem nivoju. Višje hidrationske lupine smo obravnavali na nivoju reakcijskega polja topila, kar pomeni, da smo upoštevali termično povprečenje.

Iz izhodnih podatkov programa Gaussian09 smo izračunali prosto energijo hidratacije histamina v vodi -67,5 kcal/mol, kar se precej približa eksperimentalni vrednosti -69,2 kcal/mol (30). Za devteriran sistem pa smo izračunali prosto energijo hidratacije -67,2 kcal/mol. Prosta energija hidratacije histamina v devterirani vodi je za 0,26 kcal/mol višja in posledično manj ugodna kot v običajni vodi (preglednica IV).

Preglednica IV: Prosta energija hidratacije histamina v vodnem in devteriranem okolju.

v H ₂ O	v D ₂ O	$\Delta\Delta G_{\text{HIDRAT. (H}_2\text{O} - \text{D}_2\text{O})}$ (kcal/mol)
$\Delta G_{\text{HIDRAT.}}$ (kcal/mol)	$\Delta G_{\text{HIDRAT.}}$ (kcal/mol)	
-67,5	-67,2	-0,3

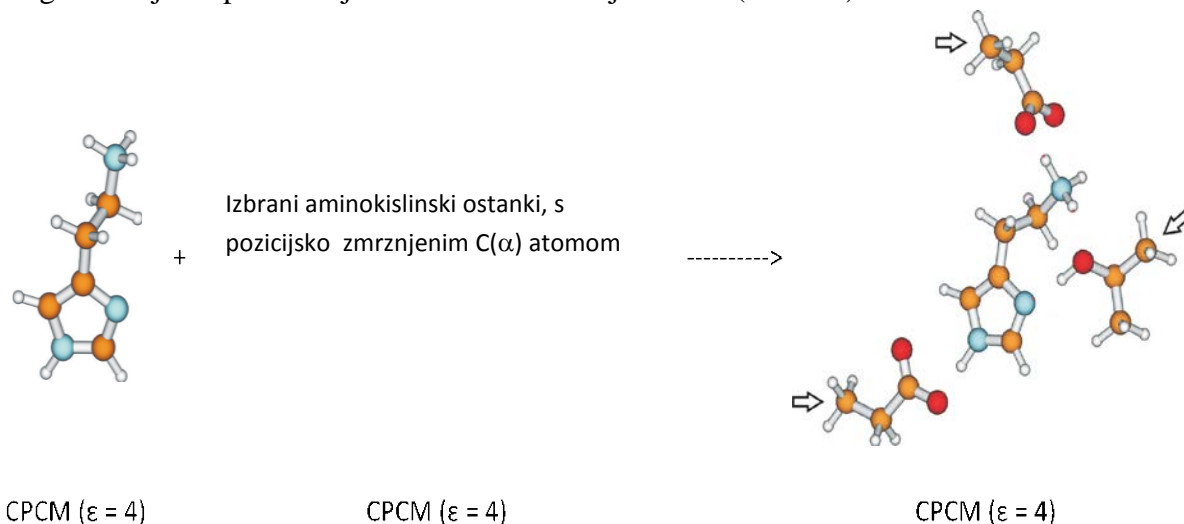
5.2 HISTAMIN – HISTAMINSKI RECEPTOR H₂

Zasnovali smo modelni sistem histamina v interakciji s tremi aminokislinskimi ostanki receptorja, ki so ključni za vezavo histamina na histaminski receptor H₂.

Za izračun proste energije interakcije histamin – histaminski receptor H₂ (ΔG^{INTER}) smo uporabili najstabilnejšo tautomerno obliko monoprotiranega histamina. ³H-imidazol tautomerno obliko smo v programu Molden skonstruirali skupaj z aminokislinskimi ostanki Asp98, Asp186 in Thr190 histaminskega receptorja H₂. Ti aminokislinski preostanki so se v raziskavah z usmerjeno mutagenozo izkazali za ključne pri vezavi histamina na histaminski receptor H₂.

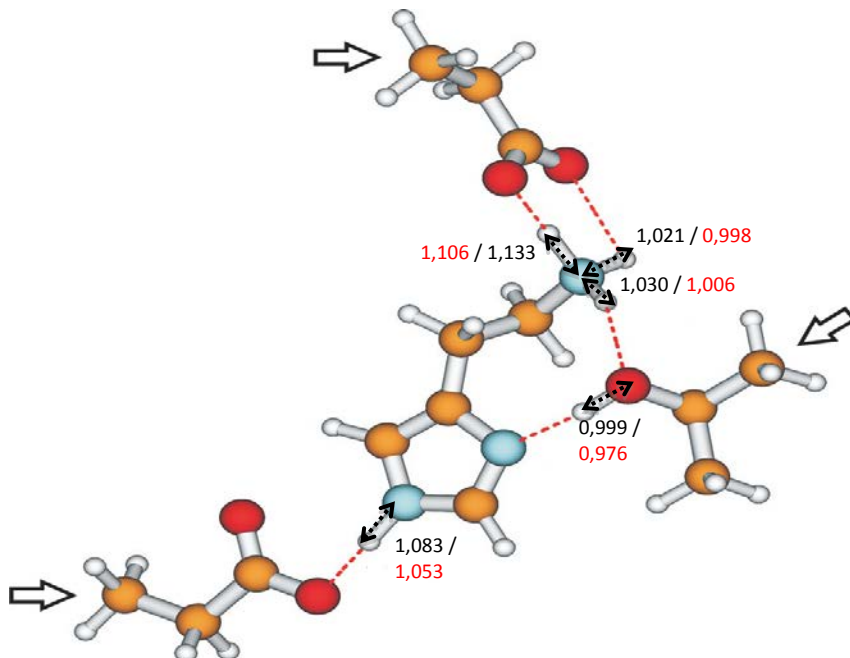
Vsak aminokislinski ostanek smo zamrznili na C_(α) atomu le-tega.

Po geometrijski optimizaciji smo dobili naslednjo shemo (slika 21):



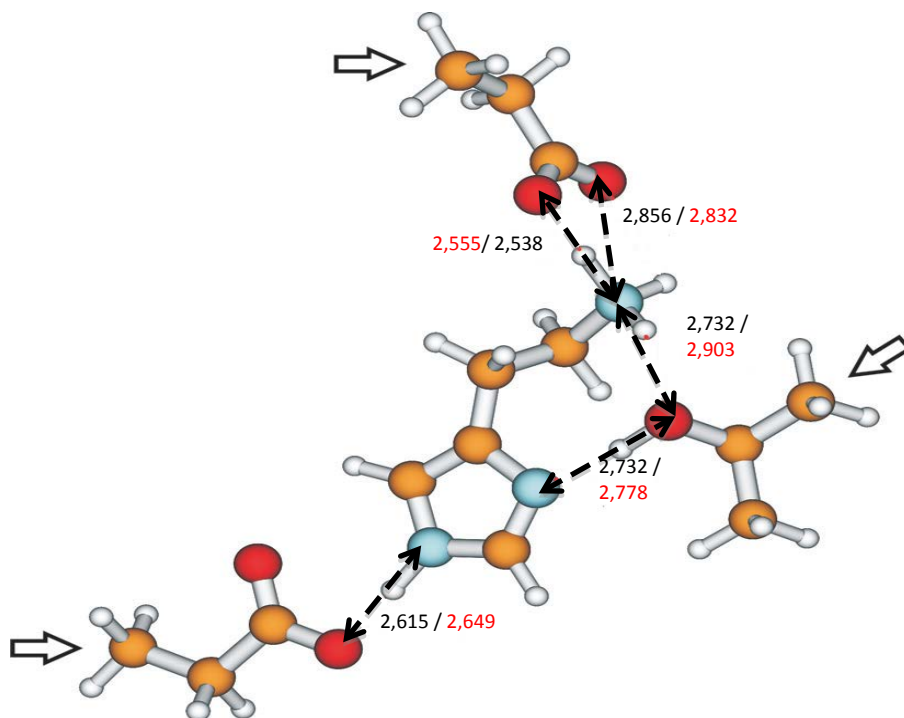
Slika 21: Shema geometrijske optimizacije.

Po geometrijski optimizacije sistema z vodikom, smo dobljene dolžine vezi N-H in O-H, ki so udeležene v tvorbo vodikovih vezi med histaminom in vezavnim mestom histaminskega receptorja H₂ skrajšali za 2,3 % (slika 22).



Slika 22: Sprememba razdalje N-H in O-H po devteriranju sistema histamin – vezavno mesto histaminskega receptorja H₂. S črno barvo so označene dolžine vezi N-H in O-H, z rdečo pa dolžine vezi N-D in O-D. C_(w) ogljiki posameznih aminokislinskih ostankov so označeni s puščicami.

Zaradi skrajšanja vezi N-H in O-H je prišlo do podaljšanja razdalj med donorjem vodika (N oziroma O) in akceptorjem vodika (O oziroma N) (slika 23).

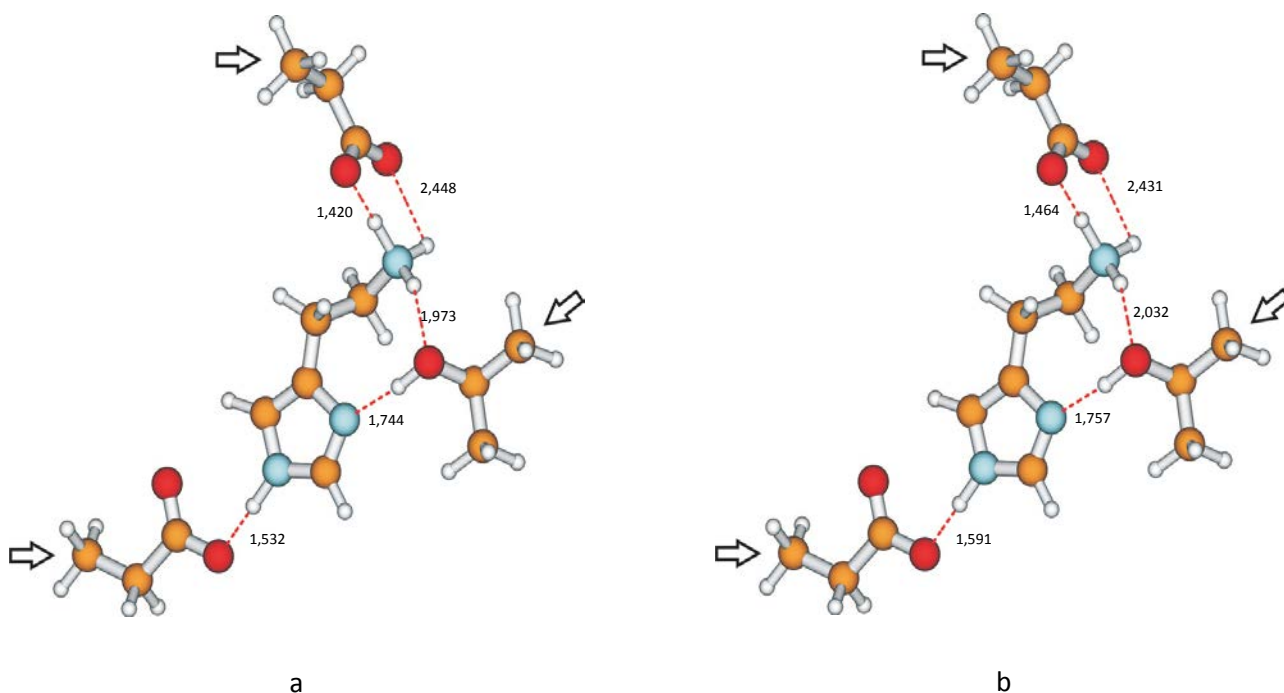


Slika 23: Sprememba razdalje med donorjem vodika in akceptorjem vodika po devteriranju.

S črno barvo so označene razdalje O...N pred devteriranjem, z rdečo pa razdalje O...N po devteriranju. C_(α) ogljiki posameznih aminokislinskih ostankov so označeni s puščicami.

Zaradi Ubbelohdejevega efekta je posledično prišlo do podaljšanja vodikovih vezi med devteriranim histaminom in devteriranim vezavnim mestom histaminskega receptorja H₂ (slika 24). Zaradi spremenjenih dolžin vodikovih vezi, je prišlo tudi do spremembe proste energije interakcije histamina z vezavnim mestom histaminskega receptorja H₂. V sistemu z vodikom le-ta znaša -62,05 kcal/mol, v sistemu z devterijem pa -61,28 kcal/mol.

Prosta energija interakcije je torej za 0,77 kcal/mol ugodnejša v sistemu z vodikom kot v sistemu z devterijem (preglednica V).



Slika 24: Struktura H-histamina in D-histamina v interakciji z vezavnim mestom receptorja H₂. (a) H-histamin, (b) D-histamin. C_(α) ogljiki posameznih aminokislinskih ostankov so označeni s puščicami.

Prav tako kot v primeru hidratacije smo pri izračunih interakcijske energije histamina z receptorskim vezavnim mestom uporabili metodo supermolekul. Vodilni člen v tej interakciji predstavlja interakcija ion-ion med protoniranim histaminom in dvema karboksilatnima skupinama dveh aspartatov. Zelo tehtno vprašanje, ki se postavi je povezano z dinamiko protona pri vezavi histamina na vezavno mesto. V našem delu smo predpostavili, da se protoni pri vezavi histamina na vezavno mesto, ne premikajo. V kompleksni polarni in fluktuirajoči okolici vezavnega mesta na receptorju se zlahka zgodi, da je vezava liganda z receptorjem povezana z reakcijo prenosa protona. Zlasti dober kandidat je proton na obročni NH skupini molekule histamina. Aktivacija receptorja bi bila lahko tudi posledica reakcije prenosa protona. Dinamiko prenosa protona kontrolirajo vrednosti pK_a in bariera za prenos protona. Pri devteraciji se te vrednosti spremenijo in tipično reakcije prenosa protona postanejo počasnejše. Posledica je spremenjen odgovor receptorja na devterirane zvrsti.

Prepričani smo, da bi rezultati NMR in vibracijske spektroskopije dali odgovore na ta vprašanja.

Preglednica V: Prosta energija interakcije histamina z vezavnim mestom histaminskega receptorja H₂.

Sistem s H	Sistem z D	$\Delta\Delta G_{\text{inter. (H - D)}}$ (kcal/mol)
$\Delta G_{\text{INTER.}}$ (kcal/mol)	$\Delta G_{\text{INTER.}}$ (kcal/mol)	
62,05	-61,28	-0,77

5.3 HISTAMIN – HISTAMINSKI RECEPTOR H₂ - VODA

Celotno spremembo proste energije vezave histamina na histaminski receptor po devteriranju ($\Delta G_{\text{VEZAVNA}}$) smo izračunali z uporabo podatkov iz preglednice VI:

$$\Delta G_{\text{H} \rightarrow \text{D}}^{\text{VEZAVNA}} = \Delta G_{\text{H} \rightarrow \text{D}}^{\text{INTER.}} - \Delta G_{\text{H} \rightarrow \text{D}}^{\text{HIDRAT.}} = -0,49 \text{ kcal/mol}$$

Iz rezultata je razvidno, da se tvorijo močnejše vodikove vezi med histaminom in histaminskim receptorjem H₂, kot pa med histaminom in vodo. Kar pomeni tudi, da smo z devteriranjem povzročili večjo spremembo proste energije v sistemu histamin – histaminski receptor H₂, kot v sistemu histamin – molekule vode.

Vrednost -0,49 kcal/mol se precej približa eksperimentalno določeni vrednosti -0,51 kcal/mol (30), kar je glede na to, da smo uporabili dokaj enostaven model za kvantizacijo gibanja jedra, izjemno dober rezultat. Tako dobro ujemanje je verjetno tudi posledica izničenja napak. S tem smo potrdili, da moramo pri računanju spremembe vezavne proste energije histamina na histaminski receptor H₂ upoštevati tudi vodo in prispevek proste

energije hidratacije. Prav tako je izjemno pomembno, da načrtujemo pravilno shemo za razporeditev vode okrog histamina in s ponavljanjem izračunov z različnimi razporeditvami vode pridemo do le-te.

Preglednica VI: Spremembe vezavne proste energije histamina po devteriranju. Vse proste energije so izražene v kcal/mol.

	$\Delta G(\text{H}_2\text{O})$	$\Delta G(\text{D}_2\text{O})$	$\Delta G^{\text{VEZAVNA}}_{\text{H} \rightarrow \text{D}}$
hidratacija, $\Delta G^{\text{HIDRAT.}}$	-67,5	-67,2	-0,26
Interakcija histamin receptor, $\Delta G^{\text{INTER.}}$	-62,1	-61,3	-0,77
EKSPERIMENTALNO, $\Delta G^{\text{VEZAVNA}}_{\text{EKSP}}$			-0,49
TEORIJA, $\Delta G^{\text{VEZAVNA}}_{\text{TEOR}}$	5,4	5,9	-0,51

V primeru izpostavitve molekule histamina in vezavnega mesta histaminskega receptorja H₂ devteriranem mediju, se zaradi izmenjave protonov z devteroni spremenijo geometrije in energije vodikovih vezi med molekulami vode in molekulo histamina ter med molekulo histamina in vezavnim mestom histaminskega receptorja H₂. V obeh primerih je po devteriranju prišlo do sprememb razdalj in jakosti vodikovih vezi. Zaradi kinetičnega izotopskega efekta in posledično nižje energije nulte točke devteriranih zvrsti ter anharmoničnosti vodikove vezi, se je razdalja med donorjem protona in protonom skrajšala, razdalja med donorjem protona in akceptorjem protona pa se je povečala. Posledično se je vodikova vez podaljšala, jakost podaljšane vodikove vezi pa se je zmanjšala. Posledica vseh teh sprememb so spremenjene vezavne lastnosti ter zmanjšana afiniteta histamina do histaminskega receptorja H₂ po devteriranju.

Možna aplikacija predlaganega modela je tudi na primeru receptorjev za voh (receptorji sklopljeni s proteinom G, razred A) :

V članku *Molecular vibration-sensing component in Drosophila melanogaster olfaction* so avtorji Franco s sodelavci (31) preučevali sposobnost vonja vinske mušice (*Drosophila melanogaster*). Ugotovili so, ne le, da vinska mušica zazna vonj acetofenona temveč tudi, da loči vonj različno devteriranih molekul acetofenona. Na podlagi tega rezultata, so predpostavili, da vinska mušica zaznava vibracije različno progresivno devteriranega liganda. Dejstvo, da so vinske mušice ločile med vonjem devteriranih in nedeuterirane oblike acetofenona, so avtorji pripisali sposobnosti vohalnega sistema vinske mušice, da zazna vibracijski spekter molekule acetofenona. Hettinger je (32) zavrnil to razlago, ker se vonj ne zaznava preko spremembe vibracij v vibracijskem spektru, poleg tega imajo lahko snovi z značilno različnim vonjem podobne vibracijske spektre.

Na podlagi rezultatov, pridobljenih v naših izračunih, bi predlagali drugačno razlago rezultatov preučevanja vonja mušice *Drosophila melanogaster*, ki so jo izvedli Franco s sodelavci. Pri devteriranju aromatskega ostanka pride do skrajšanja vezi C-D v primerjavi z dolžino vezi C-H. Aromatske vezi C-H se namreč obnašajo kot proton donorji in tvorijo šibke vodikove vezi z molekulami vode in proton akceptorji vezavnega mesta receptorja. Prav tako se zaradi devteriranja zmanjša kvadrupolni moment aromatskega ostanka. Devteriranje vpliva tudi na interakcije dipol - kvadrupol in morebitne interakcije med kationom in π -sistemom. Kot v primeru s histaminom devteriranje vpliva tudi na prosto energijo interakcije z okoljem. Spremembe v primeru acetofenona manjše bi morale biti manjše kot v primeru histamina, zaradi manjše polarosti vezi C-H aromatskega ostanka glede na vez N-H v histaminu.

Voh je najmanj poznan čut pri sesalcih. Proces vonja se začne z aktivacijo receptorja za voh v nosni sluznici pri ljudeh oz. tipalke pri žuželkah. Receptorji za voh spadajo v razred A z beljakovino G sklopljenih receptorjev. Po aktivaciji receptorja sledi prevajanje signala po prvem možganskem živcu (n. olfactorius) do centra za vonj v možganih (bulbus olfactorius). Posamezna molekula snovi z vonjem lahko aktivira en ali več podtipov receptorjev za vonj, zaznava pa se integrira v osrednjem živčevju. Center za voh je relativno majhen pri ljudeh; pri nižjih živalskih vrstah pa predstavlja velik del možganov.

V tem diplomskem delu smo uporabili na prvi pogled zelo enostavno metodo za kvantizacijo gibanja jeder, saj smo le skalirali razdalje proton-proton donor in za deveterirane zvrsti uporabili 2,3% krajše vrednosti. Verjamemo, da uporabljena metoda deluje, vendar bi veljalo preizkusiti rigorozno kvantizacijo nuklearnega gibanja. Integracija po poti je odlična izbira in bistvo metode je izomorfizem med valovno funkcijo in ogrlico kvantnih delcev povezanih s harmonskimi vzmetmi. Devteron ima bolj toge vzmeti med biseri kot proton in je njegova valovna funkcija bolj lokalizirana. Integracija po poti nima resolucije po stanjih in času, vendar daje pravilna ansambelska povprečja in je tako uporabna za izračune nuklearnih kvantnih efektov pri devteriranju receptorjev. Uporaba valovnih funkcij na mreži je z metodološkega stališča precej bolj zahtevna. V nadaljnjem delu bi veljalo razmisliti o spektroskopski podpori. Vibracijska in NMR spektroskopija dajeta vpogled v jakost vodikovih vezi in geometrijske parametre. Kemijski premik protona v vodikovi vezi je najbolj natančen indikator jakosti vezi in s tem povezane razdalje proton donor-proton akceptor. Premik NH valenčnega nihanja v vibracijski spektroskopiji je merilo za jakost vodikovih vezi. Verjetno bo potrebno uporabiti modelne sisteme, saj študije na celotnem receptorju, ne bi bile enostavne.

Za zaključek bi poudarili, da ostaja mehanizem aktivacije farmakoloških receptorjev eden temeljnih izzivov molekularne farmakologije (1, 33). V nasprotju z dosežki racionalnega načrtovanja zdravilnih učinkovin pri načrtovanju inhibitorjev encimov in zaviralcev ionskih kanalov, v razmerah *in silico* še vedno ne znamo ločiti ali je določena snov agonist, ali antagonist določenega receptorja. Razlikovanja ali je določena snov agonist ali antagonist nam ne omogočajo tudi vezavne študij s pomočjo radioligandov. Res je, da imajo antagonisti večjo afiniteto do vezave na vezavno mesto na receptorju kot agonisti in da je afiniteta vezave antagonistov enaka do s proteinom G sklopljenim in s proteinom G neslopljenim receptorjev. Nasprotno, agonist izkazuje večjo afiniteto do s proteinom G sklopljenim receptorjev in zaradi tega se po analizi rezultatov zdi, da se agonisti vežejo na dve različni populaciji receptorjev. Z vezavnimi študijami prav tako ne moremo napovedati ali bo določena učinkovina izzvala učinek ali ne.

Metoda, ki bo sposobna napovedati mehanizem vezave liganda na receptor in nam hkrati dala podatke o aktivaciji receptorja oz. receptorjev, bo omogočila zmanjševanje števila poskusov, ki vključujejo uporabo biološkega materiala. Olajšala bo tudi neposredno načrtovanje novih ligandov – zdravilnih učinkovin z zelenimi lastnostmi.

Devterirani ligandi zelo verjetno ne bodo nikoli vstopili v klinično uporabo, saj se devteroni prehitro izmenjajo s protoni vode in proteinov v okolici. Pristop pa bo obstal kot raziskovalno orodje v nadaljnjem iskanju mehanizma vezave liganda na receptor in mehanizma aktivacije receptorjev.

6. SKLEP

Z obravnavo nuklearnega kvantnega efekta smo potrdili, da ima vodikova vez izjemno pomembno vlogo v interakciji histamina z aktivnim mestom histaminskega receptorja H₂ in pri orientiranosti vode okrog molekule histamina. Če vodikove atome, ki sodelujejo pri tvorbi vodikove vezi v procesu vezave liganda na receptor, zamenjamo z atomi devterija, se spremenijo intermolekularne in intramolekularne razdalje. To vodi v strukturne spremembe liganda ter vezavnega mesta na receptorju in posledično do spremenjene afinitete histamina do histaminskega receptorja H₂.

V diplomskem delu smo potrdili vse tri postavljene hipoteze in prišli do naslednjih zaključkov:

- Potrdili smo, da se vrednost proste energije hidratacije histamina v devterirani vodi zviša. Zaradi podaljšanja razdalje med donorjem in akceptorjem protona pride v devterirani vodi do podaljšanja vodikovih vezi, kar je energijsko manj ugodno.
- Potrdili smo, da se po devteriranju vrednost proste energije interakcije histamina s tremi aminokislinskimi ostanki, ki so ključni za njegovo vezavo na histaminski receptor H₂, poviša, kar je tudi v tem primeru posledica spremenjene dolžine vodikovih vezi, ki se vzpostavijo, ko pride histamin do aktivnega mesta receptorja.
- Potrdili smo, da ima devteriran histamin drugačno afiniteto do histaminskega receptorja H₂ kot nedeuteriran histamin. In sicer je prišlo zaradi večjega vpliva devteriranja na vodikove vezi, ki se tvorijo med histaminom in vezavnim mestom histaminskega receptorja H₂, kot na vodikove vezi, ki se tvorijo med histaminom in molekulami vode, do zmanjšanja afinitete po devteriranju.

7. LITERATURA

- 1 Rang HP, Dale MM, Flower RJ: **Rang & Dale's Pharmacology**, 6th Edition, Churchill Livingstone, Oxford, 2007: 8-53, 213-4.
- 2 Čarman-Kržan M: **Molekularna farmakologija membranskih receptorjev**. Med Razgl 1987; 26: 31-51.
- 3 Lemke TM, Williams DA, Roche VF, Zito SW: **Foye's Principles of Medical Chemistry**, 6th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 2008: 1004-27.
- 4 Leurs R, Smit MJ, Timmerman H: **Molecular Pharmacological Aspects of Histamine Receptors**. Pharmacol Therapeut 1995; 66: 413-63.
- 5 Shahid M, Tripathi T, Sobia F, Moin S, Siddiqui M, Ali Khan R: **Histamine, Histamine Receptors, and their Role in Immunomodulation: An Updated Systematic Review**. Open Immunol J, 2009, 2, 9-41.
- 6 Offermanns S, Rosenthal W: **Encyclopedia of Molecular Pharmacology**, 2nd Edition. Springer 2008: 588-591.
- 7 Haas HL, Sergeeva OA, Selbach O: **Histamine in the Nervous System**. Phys. Rev. 2008; 88: 1183-241.
- 8 Siegel GJ: **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects**, 7th Edition, Elsevier Academic Press, Burlington, 2006: 123-37, 167-83, 249-65.
- 9 Čarman-Kržan M, Lipnik-Štangelj M: **Molecular properties of central and peripheral histamine H1 and H2 receptors**. Pflugers Arch 2000; 439: 131-2.

- 10 Del Valle J, Gantz I: **Novel insights into histamine H₂ receptor biology**, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 1997; 273: 987-996.
- 11 Miertus S, Scrocco E, Tomasi J: **Electrostatic Interaction of a Solute with a Continuum - a Direct Utilization of Abinitio Molecular Potentials for the Prevision of Solvent Effects**. Chem Phys 1981; 55: 117-129.
- 12 Neubig RR, Spedding M, Kenakin T, Christopoulos A: **International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on Terms and Symbols in Quantitative Pharmacology**. Pharmacol Rev 2003; 55: 597-606.
- 13 Guyton AC, Hall JE: **Textbook of Medical Physiology**, 11th Edition. Elsevier Saunders, Philadelphia, 2006: 57-71, 555-71.
- 14 Rajtar S: **Vpliv amitriptilina in sertralina na kinetiko eksogenega histamina v krvi mačke v in vitro poskusih**. Med Razgl 2004; 43: 339-49.
- 15 Boyer RF: **Temelji biokemije**, Študentska založba, Ljubljana, 2005: 48-55.
- 16 Nelson DL, Cox MM: **Lehninger Principles of Biochemistry**, 5th Edition, W. H. Freeman, New York, 2008: 47-75
- 17 Stare J: **Dinamika in struktura sistemov s kratkimi vodikovimi vezmi**, Doktorska disertacija, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2003.
- 18 Bajrović F, Bresjanac M, Grubič Z, Marš T, Ribarič S, Sketelj J, Šuput D: **Seminarji iz patološke fiziologije**, 1. izdaja, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo Ljubljana, 2008: 15-25.
- 19 Brenčič J, Lazarini F: **Splošna in anorganska kemija**, 3. izdaja, DZS, Ljubljana, 2011: 55, 133-138

- 20 Efimova YM, Haemers S, Wierczinski B, Norde W: **Stability of Globular Proteins in H₂O and D₂O**. Biopolymers 2007; 85: 264-73.
- 21 De Souza JM, Freire PTC, Bordallo HN, Argyriou DN: **Structural Isotopic Effects in the Smallest Chiral Amino Acid: Observation of a Structural Phase Transition in Fully Deuterated Alanine**. J Phys Chem B 2007; 111: 5034-5039.
- 22 Casimirjeva sila. Dosegljivo na: <http://revija.fmf.si/2010/02/casimirjeva-sila/#more-758>. Dostop 27.2.2013.
- 23 M. Anderluh, J. Mravljak, A. Perdih, M. Sova, S. Pečar: **Farmacevtska kemija III, Vaje in seminarji**, DZS, Ljubljana, 2010, 106-123
- 24 Seminar iz molekulskega modeliranja pri farmacevtski kemiji III. Dosegljivo na: http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/FK/Gradiva_FK/2011-12/Seminarji/FK3_UVOD_V_SEMINAR.pdf. Dostop 27.2.2013
- 25 Birdsall NJM: **Cloning and structure: function of the H₂ histamine receptor**. Trends Pharmacol Sci, 1991;12: 9-10.
- 26 Liao RZ, Georgieva P, Yu JG, Himo F: **Mechanism of mycolic acid cyclopropane synthase: a theoretical study**. Biochemistry 2011; 50: 1505-1513.
- 27 Service RF: **Receptor Scientists to Receive Chemistry Nobel**. Science 2012; 338: 313-314. Dosegljivo na: <http://211.144.68.84:9998/91keshi/Public/File/41/338-6105/pdf/Science-2012-Service-313-4.pdf>. Dostop: 28.2.2013
- 28 Kamerlin SC, Mavri J, Warshel A: **Examining the case for the effect of barrier compression on tunneling, vibrationally enhanced catalysis, catalytic entropy and related issues**. FEBS Lett 2010; 584: 2759-2766
- 29 Vianello R, Mavri J: **Microsolvation of the histamine monocation in aqueous solution: the effect on structure, hydrogen bonding ability and vibrational spectrum**. New J Chem, 2012; 36: 954-962.

- 30 Kržan M, Repič M, Zakšek M, Pestotnik K, Fijan E, Vianello R and Mavri J:
Quantum nature of receptor activation: Deuteration changes binding affinities and activation of histamine H₂ receptor (to be submitted 2013).
- 31 Franco MI, Turin L, Mershin A, Skoulakis EM: **Molecular vibration-sensing component in *Drosophila melanogaster* olfaction**. Proc Natl Acad Sci USA 2011; 108: 3797–3802
- 32 Hettinger TP: **Olfaction is a chemical sense, not a spectral sense**. Proc Natl Acad Sci USA 2011; 108: E349
- 33 Goodman LS, Brunton LL, Chabner B, Knollmann BC, 2011. **Goodman & Gilman's pharmacological basis of therapeutics**, McGraw-Hill, New York.