

**Pro Gradu**

**Uusien alatyypivalikoivien monoamiinioksidaasi B -  
inhibiittoreiden suunnittelu**

**Mira Pasanen**



**Jyväskylän yliopisto**

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Solu- ja molekyylibiologia

04.03.2015

## ALKUSANAT

Tämän pro gradu –tutkielman laboratorio- ja bioinformatiikkatyöt tehtiin Jyväskylän yliopiston Bio- ja ympäristötieteiden laitoksella Laskennallisen biotieteen laboratoriossa.

Haluaisin kiittää ohjaajiani Olli Pentikäistä ja Sanna Niinivehmasta heidän antamastaan opastuksesta ja tuesta. Lisäksi haluaisin kiittää Mikko Ylilauria ja Jonna Nykkyä avusta laboratoriossa ja laitteiston käytössä sekä Kemian laitoksen puolelta Juhani Huuskosta ja Emmi Huhtista työni yhdisteiden syntetisoinnista.

Lopuksi haluaisin vielä kiittää perhettäni, ystäviäni ja kaikkia mukana olleita kaikesta avusta ja kannustuksesta.

Jyväskylä, maaliskuu 2015

Mira Pasanen

<b>Tekijä:</b>	Mira Pasanen
<b>Tutkielman nimi:</b>	Uusien alatyypivalikoivien monoamiinioksidaasi B –inhibiittoreiden suunnittelu
<b>English title:</b>	Discovery of novel subtype selective inhibitors of monoamine oxidase B
<b>Päivämäärä:</b>	04.03.2015 <b>Sivumäärä: 42+1</b>
<b>Laitos:</b>	Bio- ja ympäristötieteiden laitos
<b>Oppiaine:</b>	Solu- ja molekyylibiologia
<b>Tutkielman ohjaajat:</b>	Olli Pentikäinen FT, dos. ja Sanna Niinivehmas FM

---

**Tiivistelmä:**

MAO-B (MAO-B) on yksi amiinien hapetuksesta vastaavista entsyymeistä. Se vaikuttaa esimerkiksi aivoissa hermosolujen toimintaan säätelemällä hermovälittäjäaineiden pitoisuutta solun sisällä. MAO-B-inhibiittoreilla voidaan estää kyseisen entsyymin toimintaa ja täten liiallista amiinien hajotusta, joka voi johtaa muun muassa hermostosairauksiin. Tässä tutkimuksessa pyrittiin suunnittelemaan ihmisen MAO-B:hen sitoutuvien 3-fenyylikumariineja. Tutkimus jakautui kahteen osaan. Ensimmäisessä osassa tietokonemallinnuksella tietokantoja seulomalla ja löydettyjä molekyyliä telakoimalla löytyi seitsemän uutta molekyyliä, jotka sisälsivät paljon rengasrakenteita ja fluoriryhmiä. Molekyylit vuorovaikuttivat entsyymin aktiivisessa taskussa erityisesti Cys172 ja Tyr398 tai Tyr435 aminohappojen kanssa. Molekyyleille tehtyjen inhibiitioaktiivisuusmittausten perusteella yhdisteet inhiboivat MAO B:tä hyvin ja inhibiitioprosentit vastasivat tietokonemallinnuksen tuloksia. Toisessa osassa tutkittiin testiaineiden vuorovaikutuksia MAO-B:n kanssa niin tietokonemallinnuksella kuin spektrofotometrisillä *in vitro* mittauksilla. Testiaineiden kumariinirakenteessa tai siihen kiinnittyneessä 3-fenyylirenkaassa oli sitoutuneena metoksi- tai hydroksyyli-substituentteja. *In vitro* mittauksissa käytetyillä konsentraatioilla metoksisubstituoiduilla 3-fenyylikumariineilla saatiin lähes 100 %:nen MAO-B:n inhibiitio. Hydroksyyli-substituoidut yhdisteet sen sijaan inhiboivat noin 80 ja 40 %:sti. MAO-A:ta vastaan havaittiin vain matalaa inhibiitiota, mikä teki yhdisteistä selektiivisiä MAO-B:tä kohtaan. Käytettyjen substituenttien vaikutus aktiivisuuteen on myös yhtenevä aiempien tutkimusten kanssa, joissa metoksi-ryhmän on havaittu olevan hydroksyyli-ryhmää lupaavampi. Suunniteltujen molekyylien korkea inhibiitioaktiivisuus yhdessä laskennallisten tulosten kanssa osoittaa menetelmien ja suunniteltujen molekyylien hyödyllisyyden. Kehitettyä molekyyliarjaa voidaan jatkossa hyödyntää uusien MAO-B:n kautta vaikuttavien lääkkeiden, kuten Parkinsonin taudin lääkkeiden, kehityksessä.

---

**Avainsanat:** Monoamiinioksidaasi B, kumariini, Parkinsonin tauti

**Author:** Mira Pasanen  
**Title of thesis:** Discovery of novel subtype selective inhibitors of monoamine oxidase B  
**Finnish title:** Uusien alatyypivalikoivien monoamiinioksidaasi B –inhibiittoreiden suunnittelu  
**Date:** 04.03.2015 **Pages:** 42+1  
**Department:** Department of Biological and Environmental Science  
**Chair:** Cell and Molecular Biology  
**Supervisors:** Olli Pentikäinen Ph.D., docent and Sanna Niinivehmas FM

---

**Abstract:**

Monoamine oxidase B (MAO-B) is part of the enzymes responsible for the oxidative metabolism of certain amines. In the brain it can have an effect on the functions of nerve cells by controlling the neurotransmitter concentrations inside the cell. MAO-B inhibitors can be used to prevent the enzymes activity and thus excessive deamination which could lead to diseases of the nervous system. The aim of this study was to find new 3-phenylcoumarins capable of interacting with human MAO-B. The study was divided into two parts. In the first part computer modelling was used to sort through databases and to dock found molecules. Seven new molecules were found with many ring structures and fluorine substituents. These molecules interacted especially with amino acids Cys172 and Tyr389 or Tyr435 in the active site of the binding pocket of the enzyme. And based on the inhibition activity measurements of these molecules, they succeed in inhibiting MAO-B and their inhibition percentages correlated with the results in computer modelling. In the second part of the experiment eight test compounds were studied with computer modelling and spectrophotometric *in vitro* studies for their interactions and inhibition activities with MAO-B. The test compounds had methoxy or hydroxyl substituents at the coumarin or 3-phenyl structure. In the *in vitro* measurements compounds with methoxy substituent showed almost always 100 % MAO-B inhibition. Hydroxyl substituents had only about 80 % and 40 % inhibition. Inhibition against monoamine oxidase A was low making these compound selective inhibitors against MAO-B. These effects on inhibition are in line with the previous studies which show more promise with methoxy than hydroxyl substituents. The correlation between the computational results and the inhibition activities of the designed molecules shows effectiveness of both the methods and the designed molecules. The molecule series constructed here can be utilized in the future developments of new medicines involving MAO-B, like drugs for the treatment of Parkinson's disease.

---

**Keywords:** Monoamine oxidase B, coumarin, Parkinson's disease

## SISÄLLYSLUETTELO

### ALKUSANAT TIIVISTELMÄ SISÄLLYSLUETTELO LYHENTEET

<b>1. JOHDANTO.....</b>	<b>7</b>
1.1 Monoamiinioksidaasit.....	7
1.2 Monoamiinioksidaasi B.....	8
1.3 Monoamiinioksidaasi B:n inhibiitio.....	12
1.4 Parkinsonin tauti.....	12
1.5 Inhibiittoreiden haittoja.....	13
1.6 Telakointi.....	14
<b>2. TUTKIMUKSEN TAVOITTEET.....</b>	<b>15</b>
<b>3. MATERIAALIT JA MENETELMÄT.....</b>	<b>16</b>
3.1 Tietokonemallinnus.....	16
3.1.1 Proteiinin käsittely.....	16
3.1.2 Datalouhinta ja molekyylien valmistelu.....	17
3.1.3 Ydinrakenteen luonti ja valmistelu.....	18
3.1.4 Yhdistelmäkirjasto ja reagenssien valmistelu.....	18
3.1.5 Yhdistelmäkirjaston luonti.....	19
3.1.6 Telakointi.....	20
3.2 <i>In vitro</i> mittaus ja telakointi testiaineille.....	22
3.2.1 Testaus <i>in vitro</i> .....	22
3.2.2 Telakointi.....	24
3.3 Tulosten käsittely.....	24
<b>4. TULOKSET.....</b>	<b>25</b>
4.1 Seulonta.....	25
4.2 Telakointi.....	26
4.3 <i>In vitro</i> mittaukset.....	31
<b>5. TULOSTEN TARKASTELU.....</b>	<b>33</b>
5.1 Tutkittujen molekyylien rakenne-aktiivisuussuhde.....	33
5.2 Telakoinneissa vuorovaikutuksia taskun tyrosiinien ja Cys172 kanssa.....	35
5.3 Huomioitavia ongelmia.....	37
5.4 Jatkossa.....	39

### LÄHDELUETTELO

### LIITTEET

## LYHENTEET

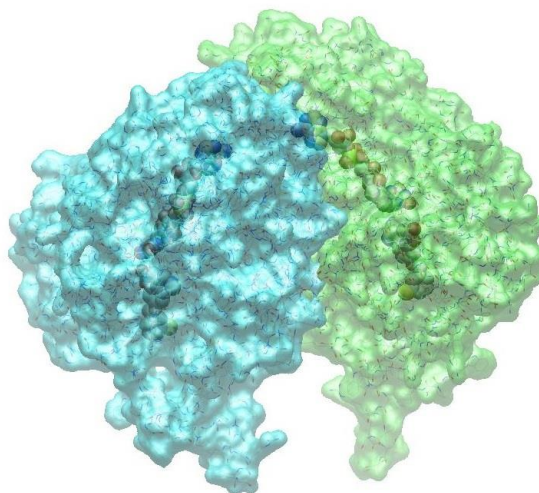
FAD	Flaviiniadeniinidinukleotidi (engl. <i>flavin adenine dinucleotide</i> )
DMSO	Dimetyylisulfoksidi
Glide	Telakointiohjelma (engl. <i>grid-based ligand docking with energetics</i> )
HRP	Piparjuuriperoksidaasi (engl. <i>horseradish peroxidase</i> )
MAO	Monoamiinioksidaasi
MAO-A	MAO-A
MAO-B	MAO-B
PDB	Protein Data Bank -tietokanta
PLANTS	Telakointiohjelma (engl. <i>Protein-Ligand Ant System</i> )
RMS	Virhe laskennallisen mallin ja mitattujen tulosten välillä (engl. <i>root-mean-square</i> )
SMILES	Kemiallisen rakenteen tiedostomuoto (engl. <i>Simplified Molecular-Input Line-Entry System</i> )

## 1. JOHDANTO

Tämä tutkielma käsittelee monoamiinioksideasi B:tä (MAO-B) ja sen toiminnan selektiivistä eli valikoivaa estämistä erilaisilla 3-fenyylikumariiniyhdisteillä. MAO-B:n inhibiition avulla saadaan lääketieteellistä apua muun muassa dopamiinin puutoksen aiheuttamien sairauksien oireisiin, kuten Parkinsonin tautia sairastavien liiketoiminnallisiin häiriöihin.

### 1.1 Monoamiinioksideasit

Monoamiinioksideasit (engl. *monoamine oxidase, MAO*) ovat solunsisäisten monoamiinien hajotuksesta vastaavia entsyymejä (Kuva 1) (ks. yleiskatsaus Robottom, 2011). Flavoproteiinien perheeseen kuuluvat MAO:t katalysoivat erilaisten monoamiinihermovälittäjäaineiden ja hormonien hapettavaa deaminaatiota aldehydeiksi ja niiden tärkeimpiin substraatteihin kuuluu muun muassa dopamiinin, serotoniini, epinefriini ja norepinefriini sekä tyramiinin ja tryptamiinin kaltaisia amiineja (ks. yleiskatsaus Bortolato ja Shih, 2011). Tapahtuakseen reaktio vaatii hapetus-pelkistys -kofaktoriksi flaviiniadeniinidinukleotidin (engl. *flavin adenine dinucleotide, FAD*). Reaktion sivutuotteena muodostuu vetyperoksidia, jonka uskotaan vaikuttavan mitokondrion toimintaan ja siten hermostoon (Hauptmann ym., 1996).



**Kuva 1.** Dimeerinen monoamiinioksideasi B, jonka sisällä flaviiniadeniinidinukleotidi ja ligandi pallo-tikku -mallilla. A-ketju sinisellä ja B-ketju vihreällä pinnalla. (PDB-koodi: 2V61).

MAO-perheeseen kuulu kaksi eri isoentsyymiä: monoamiinioksidaasi A (MAO-A) ja B (ks. yleiskatsaus Bortolato ja Shih, 2011). Nämä isoentsyymit ovat noin 70 % samanlaisia, mikä johtuu niitä koodaavien geenien samankaltaisuudesta. MAO-A:n geeni koodaa 527 aminohapon (59,7 kDa) ja MAO-B:n geeni 520 aminohapon proteiinia (58,8 kDa). Molemmat entsyymit sijaitsevat dimeerisessä muodossa solulimassa siten, että ne kiinnittyvät mitokondrion ulkokalvolle C-terminaalisen  $\alpha$ -kierteen avulla (Kuva 2) (ks. yleiskatsaus Youdim ym., 2006; ks. yleiskatsaus Bortolato ja Shih, 2011).



**Kuva 2.** Monoamiinioksidaasi B:n sekundaarirakenne ja sisällä sinisellä pinnalla piirretty ligandin sitomistasku. Kalvolle sitoutuvat  $\alpha$ -kierteet kuvan rakenteen alareunassa.

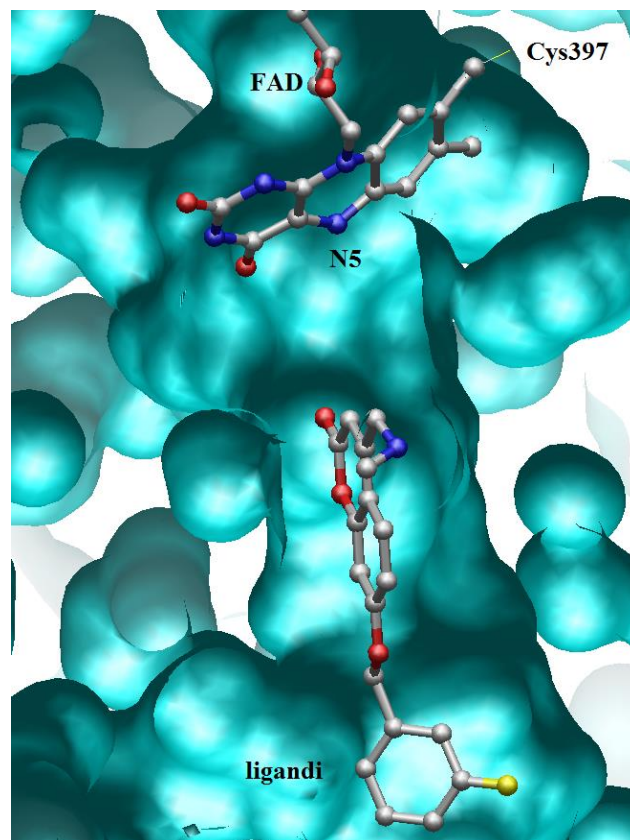
Geneettisten ja rakenteellisten samankaltaisuuksien seurauksena MAO-A ja MAO-B ovat toiminnallisesti tarpeeksi lähellä toisiaan kyetäkseen katalysoimaan samanlaisia amiinien hapetusreaktioita (ks. yleiskatsaus Bortolato ja Shih, 2011). Dopamiinin hajotus kuuluu niin kummankin toimintaan, mutta eri lajeilla ja eri kudoksissa dopamiinin hajotuksesta suurin osa kuuluu yleensä vain toiselle isoentsyymille. Ihmisten aivojen MAO:ista 70 - 80 %:ia on MAO-B:tä, jolloin sillä on myös suurempi rooli aivojen amiinien hajotuksessa (ks. yleiskatsaus Bortolato ym., 2008; ks. yleiskatsaus Robottom, 2011).



Samankaltaisuudesta huolimatta eri MAO-entsyymejä voidaan inhiboida selektiivisesti eri inhibiittoreilla (ks. yleiskatsaus Bortolato ym., 2008). MAO-A:ta voidaan inhiboida selektiivisesti esimerkiksi klogyliinillä kun taas MAO-B:tä selegiliinillä, mikä edistää täsmällisemmän vaikutuksen takaamista eri kudoksissa.

## 1.2 Monoamiinioksidaasi B

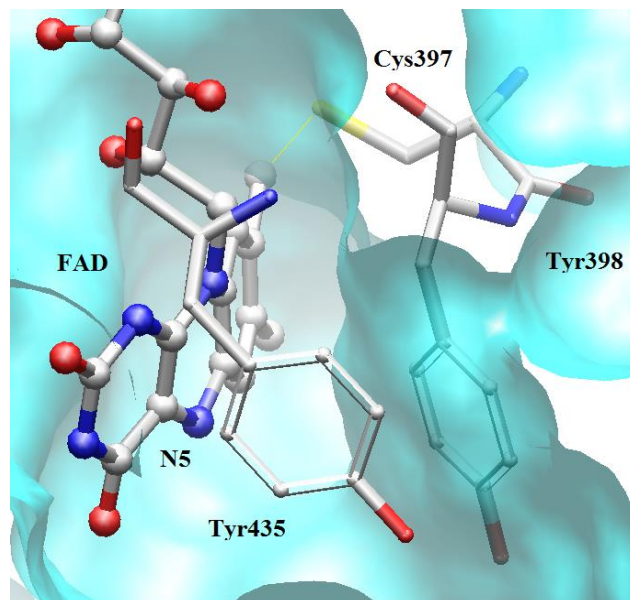
Toimiakseen kunnolla, MAO-B tarvitsee kofaktorikseen FAD:n (ks. yleiskatsaus Bortolato ym., 2008; ks. yleiskatsaus Bortolato ja Shih, 2011). MAO-B sitoo FAD:n kovalenttisesti Cys397-aminohappoon, jolloin FAD sijoittuu entsyymiin ligandia sitovan taskun perälle (Kuva 3). Ihmisen MAO-B:n ligandia sitovaan taskuun vievän käytävän sisäänkäynti avautuu entsyymiin ja mitokondrion ulkokalvon kohtauspaikkaan (ks. yleiskatsaus Youdim ym., 2006).



**Kuva 3.** Monoamiinioksidaasi B:n tasku on pitkä ja kapea. Taskun perällä flaviiniadeniininukleotidi ja kide-rakenteen ligandi pallo-tikku-mallilla (PDB-koodi: 2V61).

Sisäänkäyntiä etsivien substraattien ja inhibiittoreiden esteinä ovat sisäänkäyntiä peittävä aminohappojen 99 - 112 muodostama silmukka sekä sisäänkäynnin ja taskun välille sijoittuvien aminohappojen Tyr326, Ile199, Leu171 ja Phe168 muodostama este (ks. yleiskatsaus Youdim ym., 2006). Itse ligandia sitova tasku on tilavuudeltaan noin  $450 \text{ \AA}^3$  suuruinen hydrofobinen onkalo. Taskua reunustavien aminohapposivuketjujen asentojen muutosten ansiosta taskun on mahdollista sitoa useita erilaisia aromaattisia ligandeja, joko lähemmäs tai kauemmas FAD:sta (Binda ym., 2002).

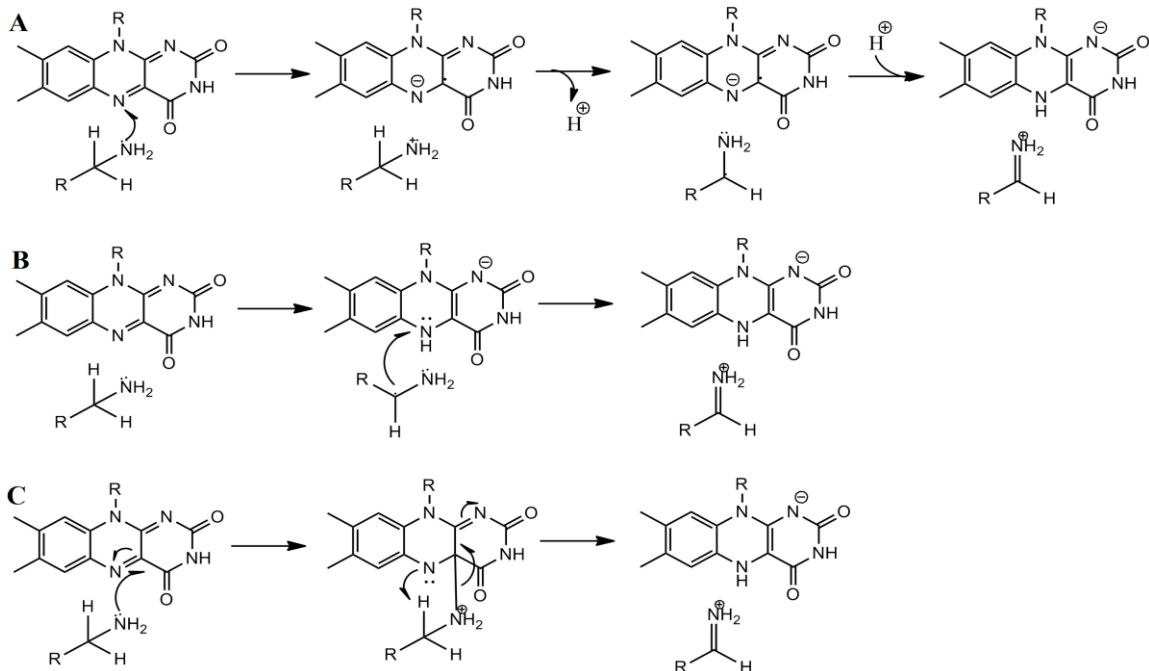
Taskussa Cys397 ja FAD:n flaviinirenkaan välinen sidos on energeettisesti epäsuotuisassa *cis*-muodossa, jotta kysteiinin vieressä oleva Tyr398 voi osallistua aromaattisten renkaiden pinoutumiseen Tyr435 kanssa (ks. yleiskatsaus Youdim ym., 2006). Tällä rakenteella uskotaan olevan suurta merkitystä substraattien ja inhibiittoreiden sitoutumisessa, sillä päästäkseen ligandia sitovan taskun perällä olevan FAD:n luokse, niiden täytyy ensin päästä kahden renkaan ohi (Kuva 4). Amiini sitoutuukin fenolisten ketjujen väliin ja yhdessä FAD:n kanssa tyrosiinit luovat aminoryhmän tunnistamisesta vastaavan alueen (Binda ym., 2002).



**Kuva 4.** Monoamiinioksidaasi B:n taskussa ligandin pitää päästä kahden aromaattisen aminohapon (tikku-mallilla) ohi päästäkseen lähelle flaviini-adeniinidinukleotidia (pallo-tikku-mallilla) (PDB-koodi: 2V61).

Kovalenttisesti sitoutuvat ligandit sitoutuvat taskussa FAD:n flaviinin N5 sijaintiin, jolloin ligandi sijoittuu Tyr398 ja Tyr435 väliin (ks. yleiskatsaus Bortolato ja Shih, 2011) (Kuva 4). Sitoutumisen yhteydessä on havaittu taskun ja käytävän yhdistyvän Ile199 kääntymisen seurauksena. Tämä on johtanut oletukseen, että Ile199 voisi toimia porttina, joka erottaa substraatin ja käytävän toisistaan. Myös Tyr326 uskotaan vaikuttavan MAO-B:n substraattien ja inhibiittorien sitoutumiseen.

FAD:n tarkasta toimintamekanismista MAO-B:n sisällä ei ole täyttä varmuutta (ks yleiskatsaus Gaweska and Fitzpatrick, 2011). Ensimmäisten teorioiden mukaan MAO B:n substraatista muodostuu radikaaleja, joko yhden elektronin siirrolla (engl. *single electron transfer*) tai vetyatomin siirrolla (engl. *hydrogen atom transfer*). Yhden elektronin siirrossa substraatin hapetus tapahtuisi samalla tavalla kuin aminien elektrokemiallinen hapetus, kun taas vetyatomin siirrossa käytettäisiin aktiivisen alueen radikaaleja vetyatomin poistamiseen (Kuva 5). Toisen teorian, nukleofiilisen mekanismin, mukaan FAD:n C4-hiili reagoisi ja saisi tehtyä N5-typestä vahvan emäksen, joka vastaanottaisi substraatilta protonin.



**Kuva 5.** Flaviiniadeniinidinukleotidin toimintamekanismin teorioita. A: yhden elektronin siirto. B: vetyatomin siirto. C: nukleofiilinen mekanismi. Kuva muokattu Gaweska ja Fitzpatrick, 2011 julkaisusta.

### **1.3 Monoamiinioksideasi B:n inhibiitio**

MAO-B:n inhibiittoreihin kuuluu muun muassa selegiliini ja rasagiliini, jotka ovat selektiivisesti sitoutuvia itsemurhainhibiittoreita (ks. yleiskatsaus Robottom, 2011). Peruuttamattomasta sitoutumisesta huolimatta selegiliinia ja rasagiliinia voidaan käyttää lääkityksenä, sillä selegiliinin oma puoliintumisaika kudoksissa on 2-10 vuorokautta ja rasagiliinin vaikutukset häviävät MAO-B:n hajotessa ja korvautuessa uusilla noin 6-30 vuorokauden kuluessa.

MAO-B-inhibiittoreiden vaikutus perustuu niiden kykyyn estää amiineja, kuten dopamiinia, pääsemästä MAO-B:n aktiiviseen taskuun (ks. yleiskatsaus Robottom, 2011). Tällöin MAO-B ei kykene hajottamaan amiineja, minkä seurauksena niiden määrän lähtee kasvuun ja esimerkiksi dopamiinin puutoksen aiheuttamat oireet lievittyvät. MAO-B-inhibiittoreita voidaankin käyttää muun muassa Parkinsonin taudin hoidossa.

### **1.4 Parkinsonin tauti**

Parkinsonin tauti on ihmisten rappeutumissairaus ja toiseksi yleisin hermostoa rappeuttavista sairauksista heti Alzheimerin taudin jälkeen (ks. yleiskatsaus Schapira, 2005; ks. yleiskatsaus Robottom, 2011; ks. yleiskatsaus Löhle ja Reichmann, 2011). Vanhemmalla iällä yleistyvä Parkinsonin tauti on yksi parhaiten hoidettavissa olevista hermostoa rappeuttavista sairauksista. Hoitomuotojen parantamisesta on kuitenkin tulossa nykyistäkin tärkeämpää väestön ikääntyessä (ks. yleiskatsaus Schapira, 2005; ks. yleiskatsaus Teo ja Ho, 2013).

Parkinsonin taudin oireiden biokemiallisen synnyn tärkeimpiin vaikuttajiin kuuluu dopamiini (ks. yleiskatsaus Bortolato ym, 2008). Dopamiini on orgaanisesti heikosti emäksinen typpiryhmän sisältävä monoamiini ja dopaminergisten hermosolujen välittäjäaine, jonka tasapainolla on suuri merkitys aivojen synaptiseen hermovälitykseen. Parkinsonin taudin oireet, kuten liikkeiden hitaus ja vapina, aiheutuvat pääasiassa aivojen dopaminergisten hermosolujen ja dopamiinin tuoton vähenemisestä (ks. yleiskatsaus Teo ja Ho, 2013). Tämän lisäksi Parkinsonin tautiin on yhdistetty myös hermosoluihin ilmestyvät, Lewy kappaleiksi kutsutut, poikkeukselliset proteiinikertymät (ks. yleiskatsaus Surmeier ja Sulzer, 2013). Näiden lisäksi myös ei-dopaminergiset reitit voivat rappeutua, jolloin taudin

oireet eivät rajoita pelkästään liikkeitä, vaan lisäoireina voi olla muun muassa dementiaa, psykoosia ja masennusta (ks. yleiskatsaus Teo ja Ho, 2013).

Taudin varhaisessa vaiheessa hoitokeinoksi riittää pelkkä MAO-B-inhibiittoreiden käyttö, sillä niillä saadaan nostettua solunsisäisen dopamiinin pitoisuutta (ks. yleiskatsaus Robottom, 2011). Sairauden edettyä pidemmälle joudutaan dopamiinin pitoisuutta nostamaan myös solun ulkopuolella. Tällöin yhteislääkitys esimerkiksi dopamiiniksi metaboloituvan levodopan kanssa toimii tehokkaammin, sillä solunsisäisen dopamiinin tason nousu voi pidentää levodopan toiminta-aikaa, ja MAO-B-inhibiittoreiden ansiosta myös solun ulkopuolisen dopamiinin pitoisuus nousee.

Lääkkeiden toivotaan tuovan Parkinsonin taudin hoitoon myös tavan parantaa itse sairautta eikä vain oireita (ks. yleiskatsaus Robottom, 2011). Tämänhetkiset MAO-B-inhibiittorit omaavat joitain hermostoa suojelevia piirteitä, sillä ne osallistuvat myös solukuoleman estoon muiden tekijöiden välityksellä ja viljelmissä ne voivat suojella dopaminergisia hermosoluja. Nämä ominaisuudet kuuluvat kuitenkin vain itse lääkeaineille, eivätkä ne liity MAO-B:n inhibiitioon. Tutkimuksia häittää myös Parkinsonin taudin eteneminen, jota ei voida mitata lineaarisesti. Toistaiseksi tutkimuksissa ei ole selvinnyt, onko inhibiittoreilla mahdollisuuksia parantaa itse Parkinsonin tautia.

## **1.5 Inhibiittoreiden haittoja**

MAO-B-inhibiittorit ovat yleensä käyttäjäystävällisiä, mutta mahdollisia sivuoireitakin löytyy (ks. yleiskatsaus Robottom, 2011). Selegiliinin käyttö voi aiheuttaa muun muassa suun kuivumista, ahdistusta ja hallusinaatioita. Selegiliinin on pelätty olevan myös myrkyllinen, sillä se hajotetaan aineenvaihdunnassa amfetamiiniksi. Rasagiliinin käytön haittapuolena on havaittu muun muassa pahoinvointisuutta ja päänsärkyä. Yleisesti MAO-B -inhibiittoreiden kanssa on vaara, että lääkkeet eivät ole riittävän selektiivisiä. Tällöin voi syntyä niin sanottu ”juustosyndrooma”, jossa MAO-A ei kykenekään prosessoimaan esimerkiksi alkoholin tai juuston kautta saatavaa suurta määrää tyramiinia, mikä johtaa lopulta verenpaine kriisiin (ks. yleiskatsaus Bortolato ym., 2008). Vakavin MAO-inhibiittoreiden mahdollisista haitoista on serotoniinioireyhtymä. Serotoniinioireyhtymä johtuu keskushermoston liian suuresta serotoniinimäärästä, jonka nousua MAO-

inhibiittorit edistävät estämällä MAO-entsyymejä pilkkomasta muitakin monoamiineja, kuten serotoniinia (ks. yleiskatsaus Robottom, 2011).

## **1.6 Telakointi**

Monet lääkeainesuunnitteluun liittyvät projektit käyttävät työssään proteiinien korkearesoluutioisia kiderakenteita ja virtuaalisten tietokantojen molekyyliä, joita tietokonemallinnusohjelmilla telakoidaan proteiinin kiderakenteeseen (Friesner ym., 2004). Telakoinnilla ja käytettävillä pisteytysmenetelmillä saadaan arvioita molekyylien sitoutumistaipumuksista. Telakointiohjelmat perustuvat proteiinin aktiivisen taskun ominaisuuksien määrittämiseen ja telakoitavan ligandin tarkkaan sijainnin, suuntautumisen ja konformaation arviointiin.

## 2. TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Aiemmissä tutkimuksissa 3-aryylikumariinien on havaittu olevan palautuvasti ja selektiivisesti MAO-B:hen sitoutuvia inhibiittoreita, joiden  $IC_{50}$ -arvot ovat olleet alle mikro- ja nanomolaarin luokkaa (Chemetti ym., 2004; Carotti ym., 2006). Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää mahdollisia kumariinijohdannaisia ja funktionaalisia ryhmiä, joilla voisi parantaa MAO-B-inhibiittoreiden aktiivisuutta ja selektiivisyyttä. Ensimmäisessä vaiheessa pyrittiin tietokonemallinnuksen avulla rakentamaan uusia kumariinijohdannaisia synteesiä ja myöhempää *in vitro* -mittausta varten. Toisessa vaiheessa tavoitteena oli mitata olemassa olevien testiaineiden kykyä selektiivisesti inhiboida MAO-B:tä.

### 3. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Tutkimus jakautui kahteen erilliseen osaan. Ensimmäisen osan tietokonemallinnuksessa etsittiin ja seulottiin molekyylejä. Molekyylejä myös telakoitiin MAO-B:n ligandia sitovaan taskuun ja niiden vuorovaikutuksia taskussa vertailtiin. Toisen osan *in vitro* spektrofotometrisissä mittauksissa sen sijaan käytettiin olemassa olevia testiaineita, joiden selektiivisyyttä ja inhibiitiokykyä testattiin rotan MAO-A:n ja B:n välillä. Testiaineiden telakoinnit suoritettiin Glide:lla (engl. *grid-based ligand docking with energetics*; Glide, version 6.2, Schrödinger, LLC, NewYork, NY, 2014; Friesner ym., 2004) ja PLANTS:lla (engl. *Protein-Ligand Ant System*; PLANTS version 1.2, Protein-Ligand ANT System; Korb ym., 2009).

#### 3.1 Tietokonemallinnus

Tietokonemallinnuksessa haettiin molekyyliden rakenteita, joista Maestrolla (Maestro, version 9.3, Schrödinger, LLC, NewYork, NY, 2012) rakennettiin yhdistelmäkirjasto. Yhdistelmäkirjaston molekyylejä telakoitiin MAO-B:n ligandia sitovaan taskuun CombiGlidella (CombiGlide, version 2.8, Schrödinger, LLC, NewYork, NY, 2012). Molekyylejä telakoitiin lisäksi vielä Glide:lla ja PLANTS:lla.

##### 3.1.1 Proteiinin käsittely

Protein Data Bank -tietokannasta (PDB) valittiin 1,70 Å resoluution kiderakenne ihmisen MAO-B:stä. Rakenne sisälsi FAD:n ja kumariinijohdannaisen ei-kovalenttisen ligandin (PDB-koodi: 2V61; Binda ym., 2007). Ihmisen MAO-A:n rakenteeksi valittiin 2,2 Å resoluution kiderakenne, joka myös sisälsi FAD:n sekä ligandin (PDB-koodi: 2Z5X; Son ym., 2008).

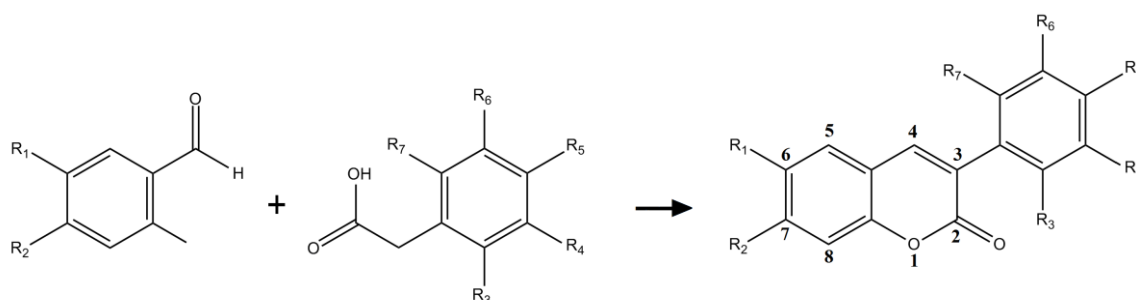
Proteiinirakenteet käsiteltiin ”Protein Preparation Wizard” -työkalulla (Protein Preparation Wizard; Epic version 2.3; Impact version 5.8; Prime version 3.1, Schrödinger, LLC, NewYork, NY, 2012) oletusasetuksilla. Proteiiniin lisättiin siitä puuttuvat vedyt ja lisäksi selenometioniinit muutettiin metioniineiksi ja vedet poistettiin 0 Å päästä heteroryhmistä, pH asetettiin 7,4 +/- 2,0 jotta se olisi lähellä ihmisen solujen sisäistä pH:ta. Selenometioniinien muutoksen takia voimakentäksi valittiin suositusten mukainen



OPLS\_2005 (engl. *optimized for liquid simulations*). ”Protein Preparation Wizard” -työkalulla etsittiin ligandista vähintään 10 Å päässä olevat aminohapot ja vetysidosten vastaanottajien lähellä olevat aspartaatti ja glutamaatti aminohapot neutralisoitiin. Ohjelmalla asetettiin myös neutraalien histidiinien protonisaatio vetysidosten muodostamiskyvyn mukaan. Viimeisessä vaiheessa proteiini-ligandi rakenne energiainimitettiin. Dimeerisestä proteiinirakenteesta poistettiin B-ketju ja siihen liittyneet ligandit ja vedet. Proteiinin A-ketju jätettiin muuttumattomaksi ja sen ligandia sitovaan taskuun luotiin Glide:n ”Receptor Grid Generation” -ohjelmalla oletusasetuksilla verkkomallinnushilat (engl. *grid*). Taskun mallinnuksessa Glide:lla arvioitiin reseptorin aktiivisen ligandia sitovan taskun alue erilaisten filttereiden avulla ja etsittiin mahdollisia kohtia ligandeille (Friesner ym., 2004).

### 3.1.2 Datalouhinta ja molekyylien valmistelu

Yhdistelmäkirjaston luontia varten tarvittiin rakenteet reagenssimolekyylejä varten. 3-fenylikumariinirakenteisten molekyylien suunnittelun ensimmäisessä vaiheessa luotiin pelkistetty kemiallinen synteesimalli halutulle inhibiittorin perusrakenteelle (Kuva 6). 2-metyyli-bentsaldehydissa funktionaalisenä ryhmänä  $R_1$  ja  $R_2$  -asemissa käytettiin metoksi-ryhmää. Fenyylitikkahapon  $R_3$ - $R_7$  -asemiin haluttiin satunnaisia funktionaalisia ryhmiä.



**Kuva 6.** 3-fenylikumariini molekyylin perusrakenteen pelkistetty synteesimalli 2-metyyli-bentsaldehydista ja fenyylitikkahaposta. Kumariineille käytetty numerointi on merkitty lopputuotteeseen.

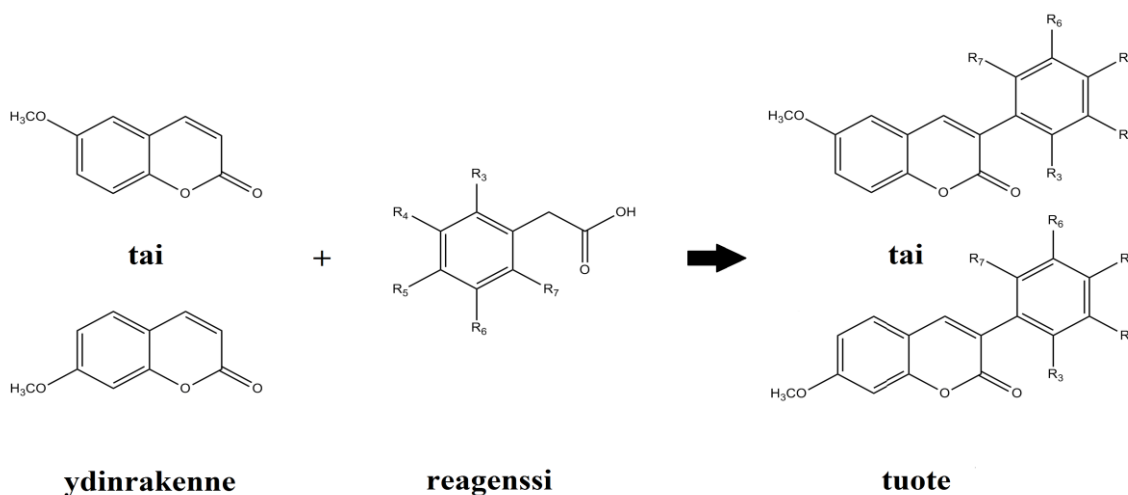
Synteesimallin perusteella haettiin 535 erilaista fenyylitikkahapporakenteista molekyyliä Reaxys -tietokannasta ([www.reaxys.com](http://www.reaxys.com)). Reaxys sisältää tietoa esimerkiksi yhdisteistä, niiden rakenteista, synteeseistä, valmistajista, tilaushinnoista. Reaxys:n löytämistä rakenteista valittiin Sigma-Aldrichin kautta saatavia reagensseja, joista luotiin SMILES -tiedostomuotoisia (engl. *Simplified Molecular-Input Line-Entry System*) reagenssitietokantoja. Tietokannat käännettiin mol2-tiedostomuotoon Sybyl -molekyli-

mallinnusohjelmalla (SYBYL-X.2.0, Molecular Modeling Software, Tripos Inc., St. Louis, MO, 2012).

Reagenssietokantojen kolmiulotteisten rakenteiden tekoon käytettiin Schrödingerin Maestro -molekyylimallinnusohjelman ligandien valmisteluun suunniteltua ”LigPrep” – työkalua (LigPrep, version 2.5, Schrödinger, LLC, NewYork, NY, 2012). LigPrepissä käytettiin oletusasetuksia, mutta ionisaatiossa käytettiin ioniser:ia luomaan jokaiselle molekyylille kaikki mahdolliset ionisaatiomuodot pH:ssa 7,4 +/- 0,0. Tautomeerien ja erilaisten konformaatioiden luonti rajoitettiin yhteen.

### 3.1.3 Ydinrakenteen luonti ja valmistelu

Yhdistelmäkirjastoon tarvittiin reagenssietokannan lisäksi myös ydinrakenteet (Kuva 7). Yhdistelmäkirjaston luonti ei kuitenkaan toimi samoin kuin kemiallinen synteesi, vaan ydinrakenteen täytyi sisältää lopputuotteen kumariinirakenne, johon reagenssirakenteet liitetään. Kaksi ydinrakennetta rakennettiin Sybyl:llä, ja käsiteltiin ”LigPrep” -työkalulla, kuten reagenssimolekyylit.

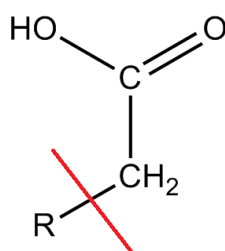


**Kuva 7.** CombiGlide -ohjelmalla tehty virtuaalisynteesi: ydinrakenne, reagenssi ja synteessin tuote.

### 3.1.4 Yhdistelmäkirjasto ja reagenssien valmistelu

Yhdistelmäkirjaston luonnissa käytettiin ”CombiGlide” sovelluksen ”Reagent Preparation” -työkalua, jolla reagenssimolekyyliden tiedostot käsitellään ennen yhdistelmäkirjaston luontia, ei kuitenkaan sisällä kyseisten reagenssien tunnistamiseen ja automaattiseen

yhdistämiseen tarvittavaa funktionaalisen ryhmän ohjetta (Kuva 8). Tarvittava funktionaalinen ryhmä luotiin muokkaamalla Maestro:n reagentprep.ini –tiedostoa, jonka loppuun lisättiin uusi koodi tarvittavasta funktionaalisesta ryhmästä ja sen toiminnasta. Ohjelma tarvitsee myös rakennetiedoston uudesta funktionaalisesta ryhmästä. Tämä rakenne piirrettiin Sybyl:llä ja tuotiin Maestro:n, jossa sen funktionaalisen ryhmän rakenteet ja atomit nimettiin ”Atom Labels” -toiminnossa ja määriteltiin koodia vastaavasti joko säilyviksi tai poistuviksi, halutun synteessin mukaan.



**Kuva 8.** Funktioaalinen ryhmä yhdistelmäkirjaston luontiin. R on säilyvä ketju ja loput (punaisen viivan toisella puolella) ovat poistettavia osia.

Reagenssiedostot käsiteltiin luotujen ohjeiden mukaan ”Reagent Preparation” -työkalulla, jossa käytettiin oletusasetuksia, ja lisäksi pH asetettiin 7.4 +/- 2.0 ja ohjelman annettiin luoda tautomeereja ja enintään 10 stereoisomeeriä jokaisesta reagenssista. Ohjeella poistettiin reagensseista etikkahappo-osat ja jätettiin kumariinin ydinrakenteeseen liitettävä fenyylisiivuketjuineen koskematta.

### 3.1.5 Yhdistelmäkirjaston luonti

Yhdistelmäkirjaston rakentamiseksi fenyylietikkahappoon pohjautuvat valmistellut reagenssiedostot vietiin Maestro:n ”CombiGlide” –sovellukseen. Sovelluksessa käytettiin ”Combinatorial Screening” –työkalua, joka tarvitsi toimiakseen ydinrakenteet, valmistellut reagenssiedostot sekä halutun proteiinin ligandia sitovan taskun mallin rakennettujen yhdistelmä molekyylien telakointia varten.

”Combinatorial Screening” -työkalussa ydinmolekyylit määriteltiin ja niiden rakenteista valittiin kohdat, joihin halutut reagenssimolekyylit liitettiin. Ohjelmalla arvioitiin

reagensseja ja poistettiin sellaiset, joiden yhdistelmämolekyylit saisi matalia pisteitä. Luodut yhdistelmämolekyylit telakoitiin proteiinitiedostosta tehdyllä taskumallilla. Yhdistelmäkirjaston luonnissa ja telakoinnissa käytettiin oletusasetuksia.

Telakointi suoritettiin kolmessa vaiheessa. Ensimmäisessä vaiheessa ohjelmalla telakoitiin ydinrakenteet. Toisessa vaiheessa ydinrakenteen liitoskohtaan lisättiin reagenssit, ja poistettiin huonosti telakoituvat yhdisteet. Kolmannessa vaiheessa telakointia normaalisti yhdisteltäisiin eri liitoskohtiin lisätyt reagenssit ja luotaisiin telakointeja, joissa jokaisella molekyylillä olisi reagenssit jokaisessa liitoskohdassa. Tämä yhdistelmäkirjasto ei kuitenkaan sisältänyt ydinrakenteita, joilla olisi useampi kuin yksi liitoskohta.

Telakoinnin jälkeen ”CombiGlide” -sovelluksella laskettiin automaattisesti yhdistelmäkirjaston molekyylien molekyylipainoja ja muita ominaisuuksia. Näiden perusteella jokaiselle molekyylille laskettiin Glide -ohjelman (ks. 3.1.6 Telakointi) käyttämät GlideScore -pisteytykset ja molekyylit järjestettiin paremmuusjärjestykseen. Yhdistelmäkirjastosta erotettiin ja tallennettiin parhaat molekyylit.

Yhdistelmäkirjastoja tehtiin yhteensä kaksi: yksi kummastakin ydinmolekyylistä. Kummastakin yhdistelmäkirjastosta erotettiin 20 telakoinniltaan parasta molekyyliä eli yhteensä 40 yhdistelmämolekyyliä, jotka käännettiin mol2 -tiedostomuotoon ja tarkasteltiin Bodil -molekyylimallinnusohjelmalla (Bodil; Lehtonen ym., 2004) tehtävään tarkasteluun.

### **3.1.6 Telakointi**

Yhdistelmäkirjastosta valikoituneet molekyylit telakoitiin vielä Glide:lla ja PLANTS:lla. Telakoinneissa käytettiin aiemmin käsiteltyä MAO-B:n ja MAO-A:n proteiimirakenteita, joista oli poistettu kiderakenteen ligandi ja lisätty vedyt. Glide:ssa käytettiin aiemmin valmisteltua proteiinin taskun verkkomallinnettua hilaa. Telakoinneissa käytettiin oletusasetusten mukaista joustavaa telakointia ja yleistä Standard Precision -tarkkuutta.

Glide:n telakoinneissa molekyylien erilaiset konformaatiot laskettiin lukuisista vaihtoehdoista, ja verrattiin proteiinin hilaan lupaavien asentojen löytämiseksi. Ohjelmalla verrattiin etäisyyksiä proteiiniin taskussa sijoittamalla molekyylit määrättyihin aktiivisen

alueen kohtiin ja vertaamalla molekyylien atomien ja aktiivisen alueen seinämien etäisyyksiä. Seuraavaksi ohjelmalla tutkittiin molekyylien atomien asemia ja poistettiin konformaatiot, jotka olivat liian suurissa steerisissä ristiriidoissa proteiinin kanssa. Tämän jälkeen laskettiin arvoja proteiinin ja molekyylien vetysidoksia muodostavien atomien perusteella, sekä arvioitiin suotuisia hydrofobisia vuorovaikutuksia ja rangaistiin steerisistä ristiriidoista.

Arvotetuista konformaatioista parhaat minimoitiin käyttämällä OPLS\_2005 voimakenttää. Ohjelman reseptorin hilaan tallettamien Coulomb ja van der Waals -kenttien avulla molekyylien vuorovaikutukset arvioitiin. Molekyylien konformaatiot, joilla oli matalia energioita, kävivät läpi Monte Carlo –simulaation, jolla pyrittiin suuntaamaan molekyylien rakenteessa olevia ryhmiä ja sisäisiä vääntökulmia. Molekyylien sitoutumistaipumuksia arvotettiin uudestaan GlideScore -pisteityksellä, joka pisteytti ja asetti tietokantojen molekyylit paremmuusjärjestykseen. Telakoidut molekyylit käännettiin mol2-muotoon.

PLANTS:n MAO-B:n rakenteelle tehdyissä telakoinneissa käytettiin 10 Å sädettä, jonka sisään telakoitavat molekyylit oli asetettava, molekyylien maksimi konformaatioiden määräksi asetettiin 10, ja telakointi keskitettiin taskun ligandinsitomisalueelle. MAO-A:n rakenteelle telakoitaessa käytettiin 13 Å sädettä. Näin telakoitavat alueet sisälsivät proteiinin koko taskun. PLANTS suorittaa telakointeja keskittämällä molekyylit määrättyihin koordinaatteihin ja niistä lähtevän säteen sallimalle alueelle. Ohjelmalla lasketaan molekyyileille erilaisia konformaatioita ja pisteitä taskun muodon ja sitä reunustavien aminohappojen ominaisuuksien perusteella.

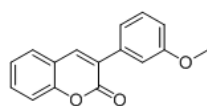
Glide:lla ja PLANTS:lla telakoidut molekyylit vietiin Bodil –molekyylimallinnusohjelmaan tarkastelua ja arviointia varten. MAO-B:n rakenteeseen telakoitujen molekyylien konformaatioita verrattiin proteiinin kiderakenteen ligandin sijoittautumiseen sekä taskun hydrofobisten ja hydrofiilisten aminohappojen sijainteihin. Bodilissa molekyyleistä poistettiin rakenteeltaan liian jäykät tai hydrofobiset vaihtoehdot. Myös liian isot tai liikaa pyöriviä sidoksia sisältävät molekyylit poistettiin. Lopuksi poistettiin valmistuskustannuksiltaan liian kalliit molekyylit. Jäljelle jääneistä molekyyleistä valittiin parhaiten proteiinin taskuun asettuvat ja siellä vahvimmin vuorovaikuttavat molekyylit, joiden synteesiä varten tilattiin reagenssit.

## 3.2 *In vitro* -mittaus ja telakointi testiaineille

*In vitro* -mittaukset suoritettiin valmiille 3-fenyyliaarylikumariineille. Mittausten jälkeen näille testiaineille suoritettiin myös telakoinnit samoin kuin edellisessä tietokonemallinnuksen osuudessa.

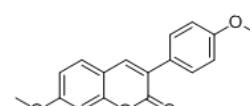
### 3.2.1 *In vitro* -inhibiitiomittaus

Liuosten valmistusohjeet ja valmistukseen käytettyjen reagenssien tiedot ovat lopussa liitteenä (LIITE 1). Rotan MAO-A ja B olivat valmiiksi eristettyinä ja niiden aktiivisuudet oli mitattu. Testiaineet syntetisoitiin Jyväskylän Yliopiston Kemian laitoksella. Testiaineita oli kahdeksa ja ne olivat 3-fenyylikumariineja, joilla oli metoksi- ja hydroksyyli substituentteja kumariinirenkaan 6- ja 7- asemissa ja/tai kumariiniin liittyneen 3-fenyylin *para*- tai *meta*- asemissa. (Kuva 9).



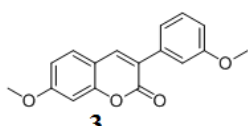
1

3-(3-methoxyphenyl)-2H-chromen-2-one



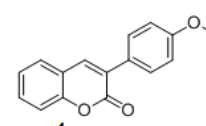
2

7-methoxy-3-(4-methoxyphenyl)-2H-chromen-2-one



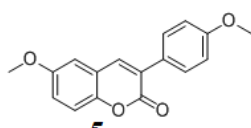
3

7-methoxy-3-(3-methoxyphenyl)-2H-chromen-2-one



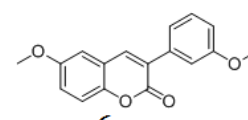
4

3-(4-methoxyphenyl)-2H-chromen-2-one



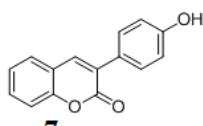
5

6-methoxy-3-(4-methoxyphenyl)-2H-chromen-2-one



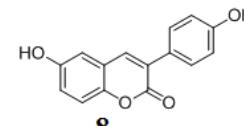
6

6-methoxy-3-(3-methoxyphenyl)-2H-chromen-2-one



7

3-(4-hydroxyphenyl)-2H-chromen-2-one



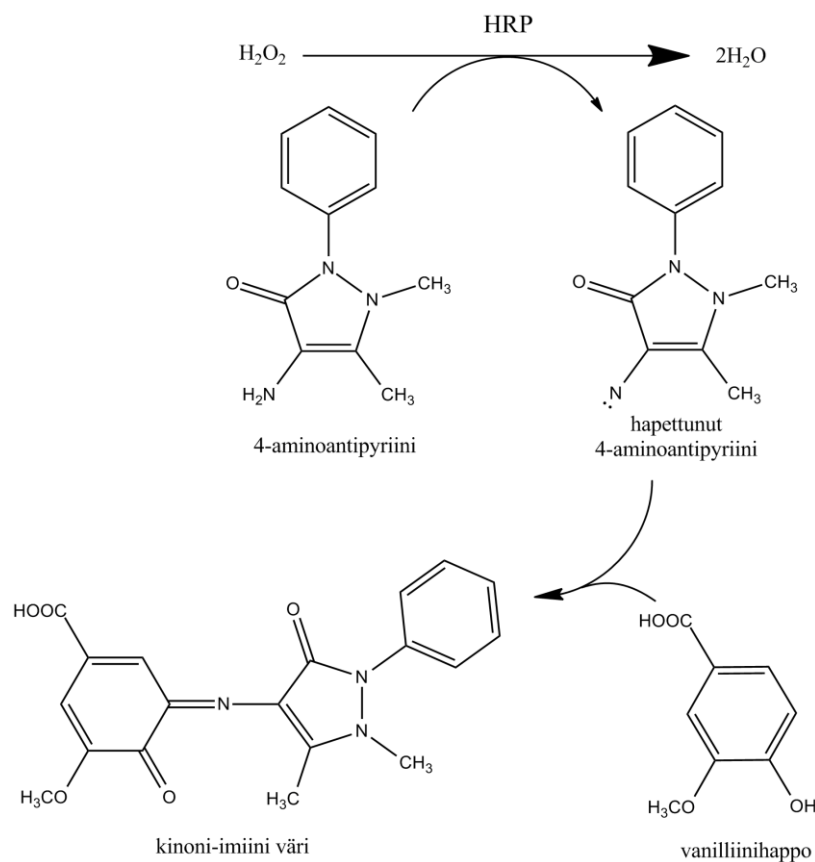
8

6-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-2H-chromen-2-one

**Kuva 9.** Testiaineiden 1-8 rakenteet ja kemialliset nimet.

Tutkimuksessa mitattiin kumariinirakenteen sisältävien testiaineiden **1-8** selektiivistä MAO-B:n inhibiitiota spektrofotometrisillä mittauksilla, Perkin Elmer Victor X4 mittauslaitteistolla. MAO-entsyymeihin sitoutuvina positiivisina kontrolleina käytettiin selektiivisesti ja palautumattomasti MAO-A:han sitoutuvaa klogryliinia ja MAO-B:hen sitoutuvaa pargyliinia. Inhibiitiota mitattiin MAO-entsyymien luonnollisen substraatin, tyramiinin, sitoutumisen kautta.

MAO:n katalysoimassa reaktiossa tyramiinisubstraatin kanssa sivutuotteena muodostuu vetyperoksidia. Vetyperoksidi reagoi 4-aminoantipyriinin ja piparjuuriperoksidaasin (engl. *horseradish peroxidase*, HRP) kanssa muodostaen hapettuneen 4-aminoantipyriinin ja vettä (Holt ym., 1997). Hapettunut 4-aminoantipyriini ja vanilliinihappo muodostavat kinoni-imiini väriä (engl. *quinoneimine dye*), jonka absorptiota spektrofotometri mittaa (Kuva 10). Väriin absorbanssi on verrannollinen muodostuneen vetyperoksidin ja siten myös sitoutuneen tyramiinin määrään.



**Kuva 10.** Pelkistetty reaktio kinoni-imiini värin muodostus. Kuva muokattu Holt ym., 1997 julkaisusta.

Koeasettelussa käytettiin tasapohjaista 96-kuoppalevyä, jolle reagenssit ja testiaineet lisättiin (LIITE 1). Testiaineiden kykyä inhiboida MAO-A:ta mitattiin yhdellä pitoisuudella ja MAO-B:n inhibiitiota kahdella pitoisuudella. Testiaineiden inhibiitiot laskettiin vertaamalla niitä tyramiinin absorbanssiin ja inhibiitioon.

### 3.2.2 Telakointi

Tietokonemallinnusosuutta vastaavanlaiset Glide ja PLANTS telakoinnit suoritettiin myös *in vitro* testattaville testiaineille 1-8. Testiainemolekyylit rakennettiin Sybylillä ja valmisteltiin ja käännettiin 3D muotoon LigPrepillä samoin asetuksilla kuin aiemmatkin telakointia varten käsitellyt molekyylit. Telakoinnit tehtiin samoin kuin edellä. Tulosten tarkasteluun ja arviointiin käytettiin Bodilia.

### 3.3 Tulosten käsittely

Telakointien tulosten käsittelyssä käytettiin Bodil –molekyylimallinnusohjelmaa, jossa molekyylit aseteltiin kuvattaviksi. Kuvien tekoon käytettiin Bodil:a yhdessä Molscript (MolScript version 2.1.2; Kraulis, 1991) ja Raster3D (Merritt ja Bacon, 1997) -ohjelmien kanssa. Kuvituksessa käytettiin myös Maestro, josta kuva otettiin ruudunkaappaus-toiminnolla. Kemiallisten rakenteiden piirtämisessä käytettiin ChemBioDraw Ultraa (version 12.0., copyright © 2007, PerkinElmer Inc.). *In vitro* mittausten ja telakointien numeeriset tulokset taulukoitiin ja käsiteltiin Gnumeric Spreadsheet (version 1.10.16, copyright © 1998-2010, The GNOME Project) –taulukkolaskentaohjelmalla, jolla piirrettiin myös kuvaajat.



## 4. TULOKSET

Seulontojen tuloksena saatiin seitsemän kappaletta sopivaan hintaan syntetisoitavissa olevia ja sitoutumismahdollisuuksiltaan hyviä 3-fenyylikumariinirakenteisia yhdistelmämolekyylejä. Spektrofotometrisissä mittauksissa testimolekyyliden havaittiin selektiivisesti inhiboivan MAO-B:tä.

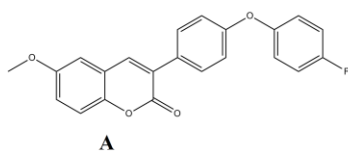
### 4.1. Seulonta

Seulonnan aikana molekyylien määrät karsiutuivat automaattisesti käytettyjen menetelmien aikana (Taulukko 1). Reaxyksesta saatiin yhteensä 535 molekyyliä, jotka Reagent Preparationin aikana karsiutuivat, jättäen 368 yhdistelmäkirjaston tekoon soveltuvaa molekyyliä. Combinatorial Screeningissä tehdyistä yhdistelmämolekyyleistä vain 260/yhdistelmäkirjasto selvisi telakoinnin asetusten vaatimuksista. Näistä yhdistelmäkirjastojen molekyyleistä valittiin 20/yhdistelmäkirjasto eli yhteensä 40 parasta molekyyliä, jotka telakoitiin vielä kerran Glide:lla ja PLANTS:lla, jolloin lopulta saatiin Bodililla tarkasteltuna seitsemän parasta molekyyliä.

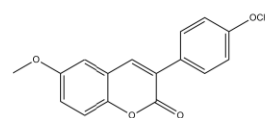
**Taulukko 1.** Molekyylien rakennemäärät eri seulontavaiheiden. Alussa (in) ja jälkeen (out).

	Reaxys (SMILES)	ReagentPrep	Combinational Screening	Glide Score järjestys	Bodil
in	-	535	368	260 + 260	20 + 20
out	535	368	260 + 260	20 + 20	7

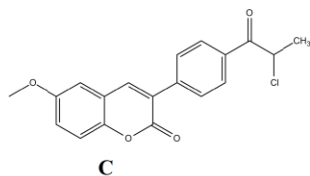
Valikoiduista seitsemästä molekyylistä (Kuva 11) molekyyleillä **A-F** metoksiyhmä on asemassa 6 ja molekyyllillä **G** asemassa 7. Molekyylien fenyylisiin kiinnittyneiden substituenttien rakenteet vaihtelevat: Molekyyllillä **A** on *para*-sijainnissa kumariiniin nähden eetterin kautta sitoutunut bentseenirengas, josta löytyy taas *para*-fluori. Molekyyllillä **B** on *para*-sijainnissa eetterin kautta sitoutuva trifluorimetoksi OCF<sub>3</sub>. Molekyyllillä **C** on *para*-sijainnissa karbonyylin kautta sitoutunut kloridiketju. Molekyyllillä **D** on *para*-hydroksyyliyryhmä ja *meta*-fluori. Molekyyllillä **E** on *p*-tertiaariamiini N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Molekyyllillä **F** on *para*-, *meta*- ja *ortho*-sijainneissa kolme fluoria. Molekyyllillä **G** on *meta*-sijainnissa eetterin kautta sitoutunut fenyylisubstituentti.



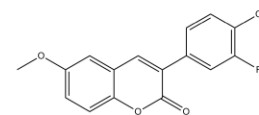
3-[4-(4-fluorophenoxy)phenyl]-6-methoxy-2H-chromen-2-one



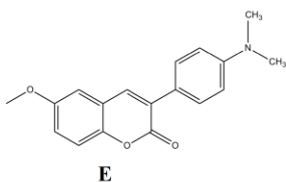
trifluoro(4-(6-methoxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)phenoxy)methanum



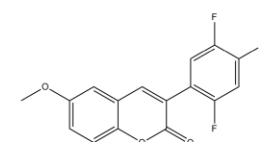
3-{4-[(2S)-2-chloropropanoyl]phenyl}-6-methoxy-2H-chromen-2-one



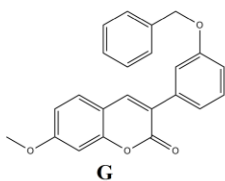
3-(3-fluoro-4-hydroxyphenyl)-6-methoxy-2H-chromen-2-one



3-[4-(dimethylamino)phenyl]-6-methoxy-2H-chromen-2-on



6-methoxy-3-(2,4,5-trifluorophenyl)-2H-chromen-2-one



3-[3-(benzyloxy)phenyl]-7-methoxy-2H-chromen-2-one

**Kuva 11.** Rakennekuvat ja kemialliset nimet seulontojen kautta valituista molekyyleistä **A-G**.

## 4.2 Telakointi

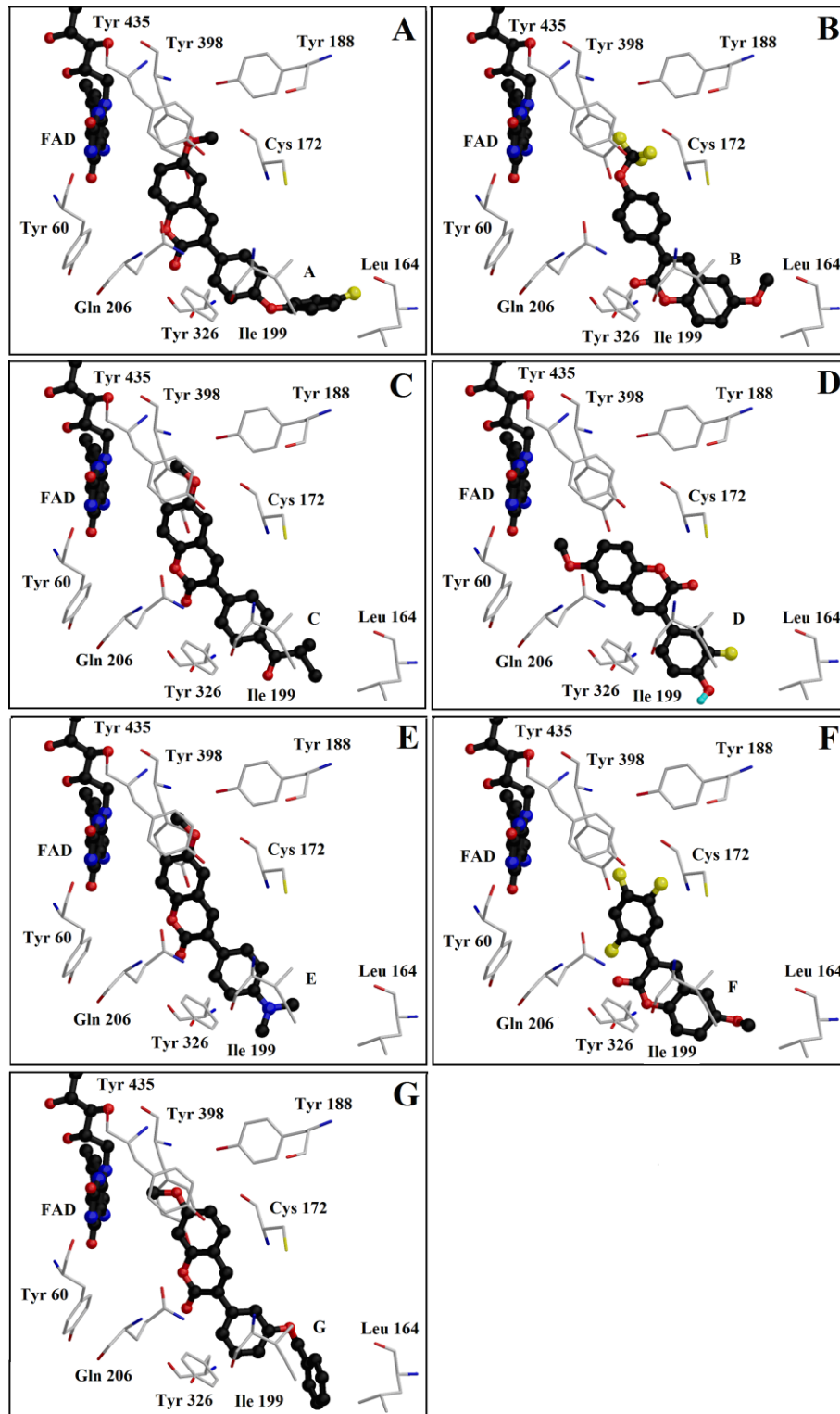
Telakoinneissa Glide pisteytti seulotut molekyylit **A-G** (Kuva 11) ja *in vitro* mitatut testiaineet **1-8** (Kuva 9) lähes samalla tavalla niin MAO-A:han kuin B:hen (Taulukko 2). Poikkeuksena oli molekyylit **A**, jota Glide ei telakoinut MAO-A:han ollenkaan. PLANTS pisteytti testiaineet ja molekyylit paremmin telakoituviksi MAO-B:hen kuin A:han.

**Taulukko 2.** Molekyylien parhaiden Glide ja PLANTS -telakointien pisteytysten tulokset MAO-A:lle ja B:lle.

Molekyyli	MAO-B GlideScore (kcal/mol)	MAO-A GlideScore (kcal/mol)	MAO-B PLANTS	MAO-A PLANTS
A	-10,50	-	-49,66	-5,87
B	-10,21	-8,41	-84,23	-25,26
C	-10,31	-8,88	-83,67	-22,31
D	-9,11	-9,16	-90,32	-47,89
E	-9,75	-9,22	-89,50	-42,42
F	-9,09	-9,26	-92,76	-51,45
G	-10,01	-6,42	-82,66	-7,06
1	-8,61	-8,09	-94,02	-61,84
2	-8,46	-8,49	-91,98	-28,57
3	-8,46	-8,18	-94,95	-53,17
4	-8,31	-8,74	-88,94	-56,46
5	-9,03	-6,76	-87,21	-44,44
6	-8,97	-9,44	-95,02	-51,80
7	-8,45	-8,76	-97,24	-61,05
8	-9,09	-9,66	-98,48	-64,24

Kaikki seulotut molekyylit **A-G** telakoituivat hyvin toisistaan poikkeavasti MAO-B:n taskuun (Kuva 12). Molekyylit **A**, **C**, **E** ja **G** telakoituivat kumariiniosa FAD:ia kohti ja nousivat hieman FAD:ia vasten niin, että kumariinien eetterin ja karbonyyli-ryhmän hapet osoittivat Tyr60 kohti. Molekyylien **A**, **C**, **E** ja **G** kumariinin hapet telakoituivat Gln206 vierelle, mutta eivät vetysidosetäisyydelle.

Molekyylin **A** 6-metoksisubstituentti telakoitui Tyr435 ja Cys172 väliin. Sen 3-fenyylin *p*-esterin happi jäi Ile199 ja Tyr326 väliin ja *p*-fluori telakoitui 2,4 Å päähän Leu164 karbonyylihapesta (Kuva 12A). Molekyylin **C** 6-metoksisubstituentin happiatomin etäisyys telakoinnissa oli 2,6 Å Tyr435 ja 2,9 Å Tyr188 hydroksyyli-ryhmän hapesta (Kuva 12C). Molekyylin **E** 6-metoksin happi asettui 2,9 Å päähän Tyr188 ja 2,7 Å päähän Tyr435 hydroksyyli-ryhmän hapesta (Kuva 12E). Molekyylin **G** 7-metoksin happiatomi telakoitui Tyr435 ja Tyr188 väliin (Kuva 12G). Molekyylien **A**, **C**, **E** ja **G** 3-fenyylisat substituentteineen suuntautuivat taskun ja taskuun vievän käytävän risteykseen.

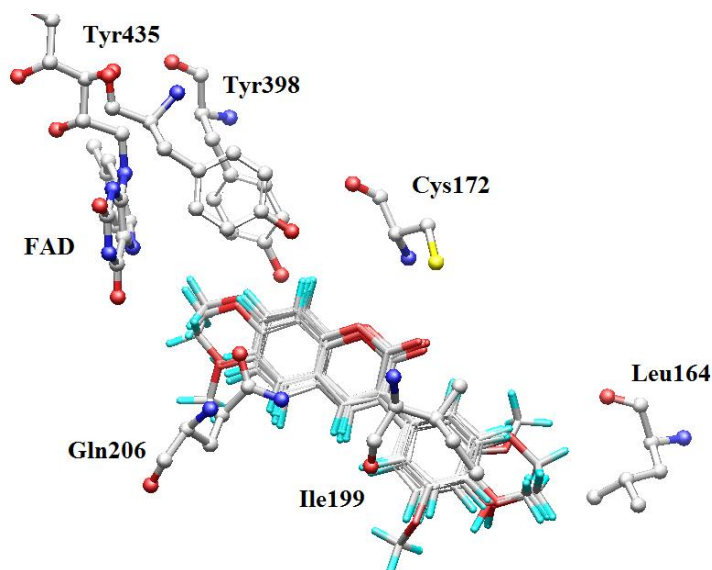


**Kuva 12.** Molekyylit A-G telakoituina MAO-B:n taskuun. Flaviiniadeniininukleotidi ja molekyylit pallo-tikku -mallilla, tummanharmailla hiiliatomeilla. Taskua reunustavat aminohapot tikkumallilla, vaalean harmailla hiiliatomeilla.

Molekyylien **B** ja **F** kumariiniosat jäivät taskun alkupäähän, jolloin niiden happiatomit jäivät Ile199 ja Tyr326 väliin, kun taas fluoriatomeja sisältävät päät suuntautuivat lähemmäs FAD:ia, mutta eivät kuitenkaan tulleet FAD:n lähelle vuorovaikutusetäisyydelle (Kuva 12B ja Kuva 12F). Molekyylin **B** 3-fenyylin *p*-trifluorimetoksin fluoriatomit telakoituivat lähimmillään 2,4 Å päähän Tyr435 sekä 2,2 Å päähän Cys172 karbonyylihapesta. Molekyylin *p*-trifluorimetoksin happi telakoitui 2,8 Å päähän Tyr435 hydroksyyli ryhmästä. Kumariinin hapet sijoituivat Ile199 ja Tyr326 lähetyville. Molekyylin **F** fenyylin *m*-fluori telakoitui 2,9 Å päähän Cys172 rikkiatomista, *p*-fluori asettui 2,9 Å päähän Tyr435 hydroksyyli ryhmästä ja *o*-fluori asettui Gln206 suuntaan. Kumariinin eetterihappi asettui 2,6 Å ja karbonyylihappi 2,9 Å etäisyydelle Tyr326 hydroksyyli ryhmästä. Karbonyylihappi asettui myös 2,6 Å päähän Gln206 typpiatomista

Molekyylin **D** kumariiniosa suuntautui FAD:n suuntaan, mutta muista samoin päin telakoituneista molekyyleistä poiketen sen happiatomit olivat kohti Cys172 (Kuva 12D). Molekyylin **D** karbonyylihappi asettui 3,0 Å etäisyydellä kysteiinin rikkiatomista. Molekyylin 6-metoksiryhmän happi telakoitui Gln206 suuntaan.

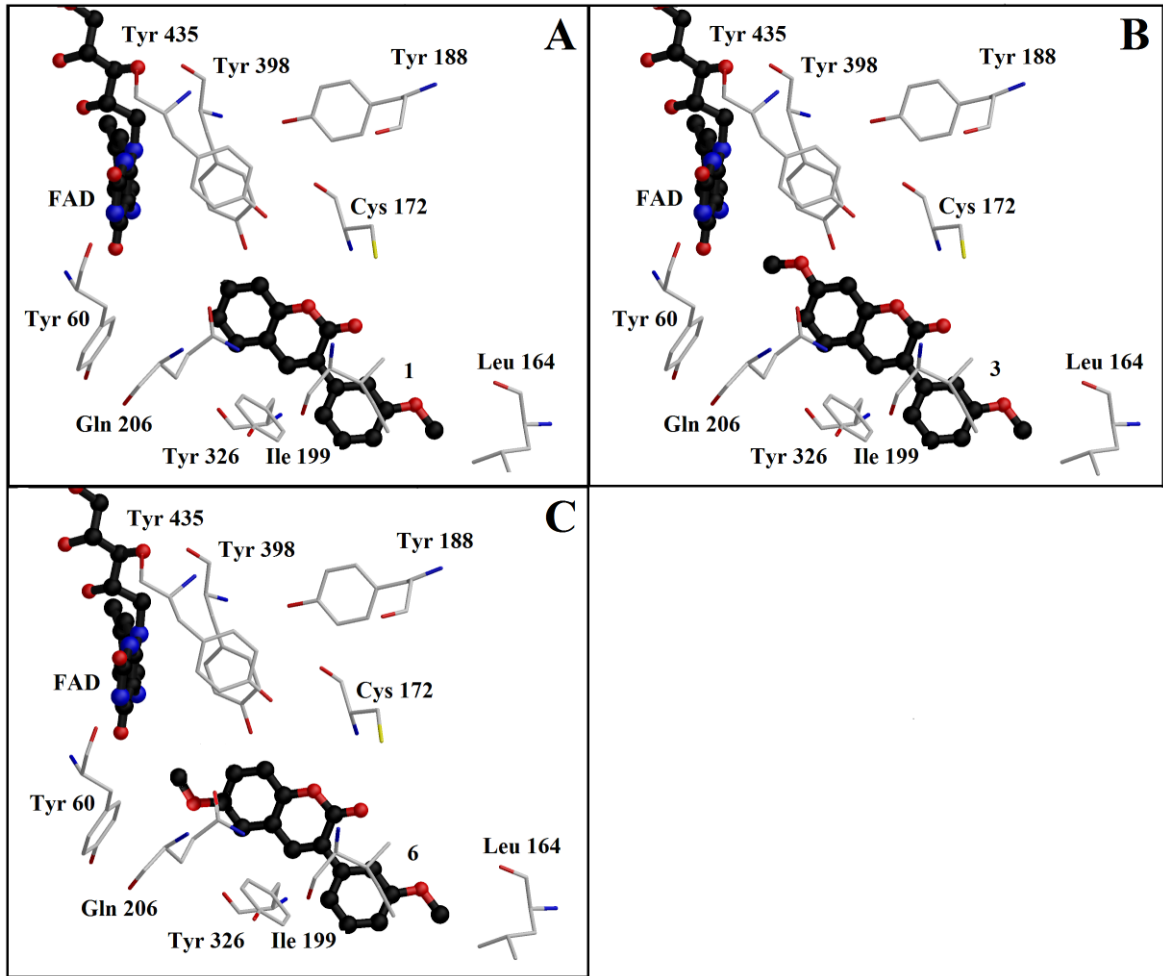
Testiaineiden **1-8** telakointien välillä oli vain pientä keskinäistä vaihtelua (Kuva 13). Kumariini substituentteineen telakoitui kohti FAD:ia, mutta ei vuorovaikutusetäisyydelle. Testiaineiden 3-fenyyli ja sen substituentit sijoittautuivat taskun eteiskäytävän puolelle. Kumariinin happiatomit osoittivat proteiinin taskun keskustaa reunustavan Cys172 suuntaan, samoin kuin molekyylin **D** telakoinnissa (Kuva 12D). Etäisyydet Cys172 rikkiatomin ja testiaineiden karbonyylihappien välillä olivat keskimäärin 3,1 Å.



**Kuva 13.** Testiaineiden 1-8 MAO-B-telakointitulosten vertailu päällekkäinasettelulla. FAD ja aminohapot pallo-tikku-mallilla, testiaineet tikkumallilla.

Testiaineilla **1**, **4** ja **7** ei ollut kumariinirakenteessa substituentteja päinvastoin kuin muilla testiaineilla (Kuva 14A). Testiaineilla **2** ja **3**, joiden 7-metoksi- tai 7-hydroksyyli-ryhmä osoittivat kohti FAD:ia jääden taskun samalla puolella olevien olevia tyrosiinien (Tyr398 ja Tyr435) alle (Kuva 14B). 6-metoksi- tai 6-hydroksyyli-substituenttien sijainnit testiaineiden **5**, **6** ja **8** telakoinneissa osuivat myös FAD:n suuntaan, mutta lähemmäs Tyr60 kuin muita tyrosiineja (Kuva 14C). Kumariinin 7-substituentin viereiselle sivulle osui Gln206, muttei vuorovaikutusetäisyydelle.

Testiaineiden **1**, **3** ja **6** 3-fenyylin metoksisubstituenttien telakointien välillä oli eroja (Kuva 14). Testiaineiden **1** ja **3** *m*-metoksi-ryhmä osoitti taskun ja käytävän välikohdassa Leu164 suuntaan. Sen sijaan testiaineen **6** *m*-metoksi-ryhmä oli fenyyliryhmän kääntymisen seurauksena suuntautunut taskuun vievää käytävää kohti, josta se pääsi Ile199 lähelle. *p*-metoksi- ja *p*-hydroksyyli-substituentit osoittivat testiaineissa **2**, **4**, **5**, **7** ja **8** proteiinin taskun eteiskäytävän suuntaan.



**Kuva 14.** Testiaineet 1, 3 ja 6 telakoituna MAO-B:n katalyyttiselle alueelle. Kaikki testiaineet 1-8 seurasivat samaa telakointiperiaatetta, mutta 3-fenyylin *m*- ja *p*-substituenttien sijainnit vaihtelivat. Pallo-tikku-mallina flaviiniadeniinidinukleotidi ja testiaine. Tikku-mallina taskua reunustavat aminohapot.

### 4.3 *In vitro* -mittaukset

Testiaineiden ja kontrollien absorbanssit olivat samansuuntaiset 0,1 ja 1,0 sekunnin mittausajalla. Absorbanssit olivat korkeimmillaan tyramiinilla ja MAO-A:n kanssa mitatuilla testiaineilla ja matalimmillaan klogyliinilla, pargyliinilla ja MAO-B:n kanssa mitatuilla testiaineilla (Taulukot 3 ja 4). Absorptioiden perusteella lasketut inhibiitioprosentit seurasivat samaa trendiä. Testiaineiden MAO-A:n inhibiitioprosentit alkoivat laskennallisesta 0 %:sta ja nousivat 30 %:iin.

**Taulukko 3.** Testiaineiden absorbanssit ja lasketut inhibiitiot. Inhibiitiot on laskettu tyramiinin inhibiition perusteella.. Absorbanssit on mitattu 1,0 s ajanjaksoilla,  $abs_{490}$  ja  $abs_{max} \sim 0,3-0,4$ .

Testi aine	Rakenne				abs			inh (%)		
					MAO-A		MAO-B	MAO-A		MAO-B
	6'	7'	meta	para	500 $\mu$ M	500 $\mu$ M	100 $\mu$ M	500 $\mu$ M	500 $\mu$ M	100 $\mu$ M
1	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	0,481	-0,014	0,022	0	106	91
2	H	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	0,339	-0,009	-0,007	30	104	103
3	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	0,448	-0,028	-0,034	7	111	114
4	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	0,384	-0,011	0,011	21	104	95
5	OCH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	0,469	0,019	0,011	3	92	95
6	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	H	0,455	-0,024	-0,017	6	110	107
7	H	H	H	OH	0,47	0,027	0,113	3	89	54
8	OH	H	H	OH	0,45	0,044	0,14	7	82	43

abs, absorbanssi; inh, inhibiitio; MAO-A ja MAO-B monoamiinioksidaaseja; meta, metasijainti 3-fenyylissä; para, parasijainti 3-fenyylissä; 6', kumariinin 6'sijainnissa; 7', kumariinin 7'sijainnissa

**Taulukko 4.** Kontrollien absorbanssit ja lasketut inhibiitiot 1,0s mittausajalla. Tyramiinin inhibiitioprosentiksi asetettiin 0 %.

Yhdiste	abs		inh (%)	
	MAO-A	MAO-B	MAO-A	MAO-B
klorgyliini	0,005	*	99	*
pargyliini	*	0,043	*	82
tyramiini	0,484	0,236	0	0

\* ei mitattu; abs, absorbanssi; inh, inhibiitio; MAO-A ja MAO-B, monoamiinioksidaaseja

Tyramiinisubstraatti sitoutui kumpaankin entsyymiin ja sen inhibiitioprosentiksi kummallekin määrättiin 0 % (Taulukko 4). Tyramiinin inhibiitioon verrattuna positiivisen kontrolli klorgyliini inhiboi MAO-A:ta 99 %:sti ja pargyliini inhiboi MAO-B:ta 82 %:sti. Testiaineet **1**, **3** ja **5-8** olivat MAO-B selektiivisiä kummallakin konsentraatiolla (Taulukko 3). Testiaineet **2** ja **4** eivät olleet yhtä selektiivisiä ja sitoutuivat 21 %:n ja 30 %:n inhibiitiolla MAO-A:han. Testiaineet **1-6** inhiboivat MAO-B:tä vähintään 91 %:sti kummallakin mitatulla konsentraatiolla, kun taas **7** ja **8** inhibiitioprosentit olivat korkeimmillaan 89 % (**7**) ja 82 % (**8**). Kun konsentraatio laski, lähtivät myös testiaineiden **7** ja **8** MAO-B inhibiitiot laskuun. Myös testiaineiden **1** ja **4** inhibiitiot laskivat, kun taas testiaineet **3**, **5** ja **6** pysyivät lähes samoina konsentraation pienenemisestä huolimatta.



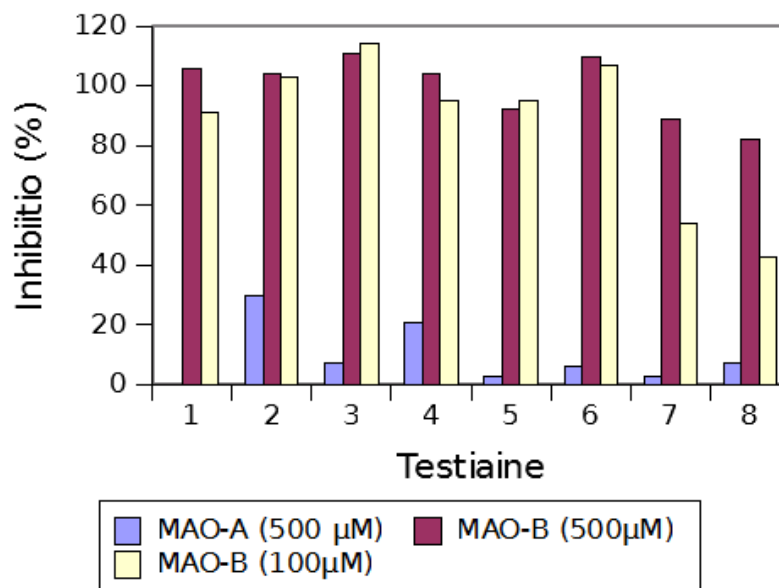
## 5. TULOSTEN TARKASTELU

MAO-B proteiinille tehtyjen PLANTS-telakointien pisteytykset ennustivat hyvin molekyylien **A**, **B**, **D**, **F** ja **G** tuloksia *in vitro* -inhibiitiomittauksissa, jotka on tehty spektrofotometrisellä menetelmällä Prof Andrea Mattevin tutkimusryhmässä (University of Pavia, Italia). Tämän tutkimuksen telakoineissa parhaiten pisteytynyt **F** inhiboi *in vitro* -mittauksissa MAO-B:ta 97 %:lla inhibiitiolla ja **D** inhiboi 99 %:sesti. Telakoinnissa toisiaan lähelle pisteytyneet **G** ja **B** saivat aikaan 94 %:sen ja 92 %:sen inhibiition. Inhibiitiomittauksissa parhaiten MAO-B:tä inhiboivat siis fluoriatomin sisältävät rakenteet. Poikkeuksena tässä oli molekyyli **A**, joka ei sijoittunut hyvin telakoinneissa ja saikin vain 31 % inhibiition. Molekyylejä **C** ja **E** ei mitattu tai saatu mitattua voimakkaan fluoresoinnin vuoksi, minkä takia telakointien pisteytysten tuloksia ei voi verrata. PLANTS kuitenkin onnistui pisteyttämään telakointeja luotettavasti Glide:en verrattuna, joka oli pisteyttänyt molekyylin **A** parhaiten taskuun sitoutuvaksi ja molekyylit **D** ja **F** huonoimmin vuorovaikuttaviksi (Taulukko 2).

Testiaineiden **1-8** telakointipisteytykset olivat hyvin tasaisia niin PLANTS:n kuin Gliden telakoinneissa (Taulukko 2). Glide ennusti kaikille testiaineille tasaista hyvää sitoutumista MAO-B:hen ja yhtä hyvää MAO-A-sitoutumista kaikille muille paitsi testiaineelle **5**. PLANTS ennusti myös tasaista MAO-B-sitoutumista, mutta huonompaa sitoutumista MAO-A:lle, johon huonoiten sitoutui testiaine **2**. Kumpikaan telakointimenetelmistä ei kyennyt tarkasti ennustamaan *in vitro* -inhibiitiomittausten tuloksia.

### 5.1 Tutkittujen molekyylien rakenne-aktiivisuussuhde

Inhibiitiomittausten tulosten perusteella tutkituista testiaineista **3** ja **6** toimivat parhaiten MAO-B:n inhibiitiossa (Kuva 15). Yhteistä näillä rakenteilla on fenyylin *m*-metoksi substituentti ja erona kumariinin metoksiryhmän sijainti.



**Kuva 15.** Kuvaaja testiaineiden **1-8** inhibiition selektiivisyydestä. Yleisesti testiaineet olivat monoamiini-oksidaasi B:lle selektiivisiä, mutta testiaineiden **2** ja **4** MAO-A selektiivisyys oli muita korkeampi.

Tutkimuksissa olennaiseksi osoittautuivat 3-fenyylin *m*-metoksi (**1**, **3** ja **6**) ja *p*-metoksi (**2**, **4** ja **5**), joista *m*-metoksilla saatiin hieman korkeammat inhibiitioprosentit, jos kumariinissa oli 6- tai 7-metoksi (Taulukko 3). Metoksisubstituentin *m*-sijainnin on aiemminkin havaittu olevan *p*- ja *o*- sijaintia aktiivisempi (Matos ym., 2009a; Matos ym., 2009b; Matos ym., 2010; Matos ym., 2014). Tämä voi johtua 3-fenyylistä, sillä fenyyli voi pyöriä kumariinirakenteeseen kiinnittyneen yksöissidoksensa kautta ympäri, tarjoten *m*-substituentille monia sitoutumissijainteja, kun taas *p*-substituentti ei saa enempää liikkumavaraa kuin mitä sen omat sidokset antavat myöten. *p*-substituentti ei myöskään tässä inhibiitiomittauksessa ollut yhtä selektiivinen MAO-B entsyymin suhteen.

Tutkittujen testiaineiden mukaan 3-fenyylin *p*-sijainnissa oleva metoksiryhmä (**4**) kuitenkin paransi inhibiitiota *m*-metoksiin (**1**) verrattuna sellaisilla molekyyileillä, joilla ei ole kumariinissa metoksisubstituentia (Taulukko 3). Vastaavanlaista ilmiötä ei ollut havaittavissa pelkällä 3-fenyylin *p*-hydroksyylisubstituentilla (**7**), jonka MAO-B inhibiitioprosentti jäi matalaksi. Matalin inhibiitioprosentti jäi molekyyylille, jolla oli 6-hydroksi- ja *p*-hydroksyylisubstituentit (**8**). Hydroksyyliyhymän on myös havaittu olevan vähemmän MAO-B selektiivinen, kuin muiden substituenttien (Matos ym., 2011; Matos ym., 2014).

Ero metoksi- ja hydroksyyli-substituenttien välillä voi selittyä sillä, että hydroksyyli-ryhmän vety vaatii vetysidoksen vastaanottajan, kun taas metoksi etsii pelkkiä luovuttajia. Toisaalta metoksiryhmä on myös isompi ja hydrofobisempi, kuin voimakkaammilla osittaisvarauksilla varustettu hydroksyyli-ryhmä. Tätä päätelmää tukisivat tulokset vielä hydrofobisemman metyyli-ryhmän paremmuudesta 6- ja 7-sijainneissa metoksiryhmän sijaan (Matos ym., 2014).

Tässä tutkimuksessa ei tutkittu metyyli-ryhmää, vaan verrattiin 6-metoksi- (**5** ja **6**) tai 7-metoksikumariinin (**2** ja **3**) vaikutusta inhibiitioon, kun verrokkina oli ilman substituentteja olevat kumariinit (**1** ja **4**). Näiden tulosten, kuten myös aiempien tulosten, mukaan 6- tai 7-metoksisubstituentti on parempi kuin ei yhtään substituenttia (Delogu ym., 2011; Matos ym., 2014) (Taulukko 3). Sijainnit todennäköisesti siis kaipaavat hieman isomman, mutta hydrofobisen substituentin. Näiden kahden sijainnin välillä suurempia inhibiitioprosentteja oli saavutettavissa 7-metoksisubstituentilla varustetuilla testiaineilla, mikä puoltaa Delogu ym. (2011) tuloksia, joiden mukaan 7-metoksikumariini on 6-metoksia inhiboivampia. Toisaalta molekyylin **G** inhibiitioaktiivisuus nousi virherajojen puitteissa 94 %:sta 98 %:iin, kun 7-metoksi vaihdettiin 6-metoksiin. Pienillä molekyyleillä 7-metoksisubstituentin paremmuus näyttää kuitenkin toistaiseksi pätevän.

## 5.2 Telakoinneissa vuorovaikutuksia taskun tyrosiinien ja Cys172 kanssa

Testiaineiden **1-8** telakoinneissa yhdisteet eivät nousseet FAD:n lähelle Tyr435 ja Tyr398 väliselle alueelle (Kuva 14). Testiaineiden kumariiniosat telakoituvat kuitenkin aktiivisen taskun hydrofiilisempään osaan, kun taas 3-fenyyliosa jäi enemmän taskun perälle hydrofobisille alueille, joista hydrofiilisten substituenttien on hankala löytää vahvoja vuorovaikutuksia. Substituentit ovat kuitenkin tärkeitä hydrofobisten vuorovaikutusten luomiseksi (Delogu ym., 2014). Testiaineiden *p*-substituentit (**2**, **4**, **5**, **7** ja **8**) eivät siis löydä vahvoja vuorovaikutuksia, mutta taskun perällä olevat aminohapot voivat päästä tarpeeksi lähelle kunnollisten van der Waals -vuorovaikutusten aikaansaamiseksi.

Taskun hydrofobista ja hydrofiilistä aluetta rajaavat Tyr326 tai Ile199 sen sijaan voivat luoda vetysidoksia tai dipoli-dipoli vuorovaikutuksia *m*-substituenttien (**1**, **3** ja **6**) kanssa, jos yhdisteen 3-fenyylä kääntyisi ympäri (Kuva 14). Ollakseen muutaman ångströmin

päässä näistä aminohapoista, koko yhdisteen olisi kuitenkin noustava lähemmäs FAD:n tunnistusaluetta. Tällaisesta liikkeestä hyötyisi myös 7-metoksisubstituentti (**5** ja **6**), joka pääsisi lähemmäs Tyr398 ja voisi toimia vetysidoksen vastaanottajana. 6-metoksi (**2** ja **3**) sen sijaan suuntautuu Tyr60 kohti, mutta ei yllä tarpeeksi lähelle vuorovaikuttaakseen muiden kuin taskun kidevesien kanssa. Ilman kumariinin substituentteja (**1**, **4** ja **7**) yhdiste ei löydä vuorovaikutuksia aktiivisen taskun puolelta kuin Cys172 kanssa.

Kaikki testiaineet telakoituivat lähelle Cys172 (Kuva 13 ja Kuva 14). Yhdisteiden kumariinin karbonyylihappi telakoitui noin 3 Å päähän suoraan Cys172 tioliryhmän vierelle. Tästä sijainnista karbonyylihapen ja tiolin rikin välille voi syntyä vahvoja dipoli-dipoli vuorovaikutuksia, mitkä voivat vaikuttaa inhibiition vahvuuteen. Yhdisteen nousu lähemmäs FAD:ia toisi myös Cys172 lähemmäs, jolloin lisävuorovaikutuksia voisi syntyä kumariinin karbonyylihapen ja kysteinin karbonyylihapen välille.

Molekyyliden **A-G** telakoinneissa testiaineita rakenteeltaan eniten muistuttava ja inhibiitiomittauksissa parhaiten suoriutunut **D** telakoitui samaan tapaan kuin testiaineet ja vastaavanlaiset yhdisteet (Matos ym., 2014; Delogy ym., 2014). Sen kumarirakenteen karbonyylihappi asettui vuorovaikutetäisyydelle Cys172 tiolista ja sen *m*-fluori olisi kääntyessään 3 Å päässä Ile199 karbonyylihapesta (Kuva 12D). Fluori voi kuitenkin helposti löytää myös telakoinnista poikkeavia vuorovaikutuksia. Hydroksyyliiryhmä *p*-sijainnissa ei löydä suoria vuorovaikutuksia, eikä myöskään 6-metoksi, joka jää liian kauas vuorovaikuttaakseen Gln206 kanssa. Metoksin ympärille jää kuitenkin hyvin tilaa vesimolekyyleille, joiden kautta on mahdollista löytää vahvempaa sitoutumista.

Molekyylit **A**, **C**, **E** ja **G** sen sijaan nousevat korkealle FAD:n eteen ja voivat muodostaa  $\pi$ -vuorovaikutuksia aromaattisten aminohappojen, erityisesti Tyr398, kanssa (Kuva 12). Kumariinin hapet jäävät telakoinnissa matkan päähän Gln206:sta, mutta jos yhdisteet liikkuvat hieman Tyr435 ja Gln206 suuntaan, voi niiden välille muodostua vety- ja dipoli-dipoli vuorovaikutuksia. Tyrosiinien 435 ja 398 luokse nouseva 6-metoksi (**A**, **C** ja **E**) voi vuorovaikuttaa myös Tyr188 kanssa.

Taskun toisessa päässä molekyylin **A** *p*-fluori pääsee vetysidoksetäisyydelle Leu164 kanssa. Molekyylin **C** fenyylistä lähtevän karbonyylihapen ja kloorin lähetyvillä ei telakoinnissa

näy vuorovaikuttavia aminohappoja, mutta reaktiivinen ja liikkuvassa hiiliketjussa kiinni oleva kloori vuorovaikuttaa todennäköisesti jonkun lähistölle osuvan aminohapon kanssa. Molekyylin **E** *p*-tertiaariamiini on myös hyvin liikkumattomassa asemassa, mutta typhen ympärillä olevat metyyliryhmät ovat hydrofobisia ja sopivat siksi hyvin tähän taskun hydrofobiseen osaan.

Molekyyliin **B** ja **F** telakointi on täysin päinvastainen kuin muilla, sillä niillä FAD:n suuntaan osoittaakin 3-fenyyli substituentteineen kun taas kumariinirakenteen hapet suuntautuvat Tyr326 suuntaan (Kuva 12). Molekyyliin kumariinien eetterihapet suuntautuvat Tyr326 suuntaan, jonka kanssa ne voivat tehdä vetysidoksen, samalla kuin karbonyylihapet vuorovaikuttaa Ile199 karbonyylihapen kanssa. Samantapaisessa konformaatioissa olevien 3-heteroaryylikumariinien on havaittu vuorovaikuttavan Gln206, Tyr326, Leu171 ja Cys172 kanssa (Delogu ym., 2011).

Molekyylin **B** *p*-trifluorimetoksi voi vuorovaikuttaa monien FAD:ia lähellä olevien aminohappojen kanssa. Tyr435, Tyr398 ja Tyr188 välillä voi syntyä vetysidoksia, kun taas Cys172 karbonyylihapen kanssa vahvoja dipoli-dipoli vuorovaikutuksia. Samaan tapaan vuorovaikuttavat myös *m*- ja *p*-fluorit molekyylissä **F**, jolloin *m*-fluori voi vuorovaikuttaa kysteiniin tiolin kanssa ja *p*-fluori Tyr435 hydroksyyliiryhmän kanssa.

Samaan tapaan molekyyliin **A**, **C** ja **E** kanssa telakoituneen **G** molekyylin 7-metoksisubstituentti asettuu Tyr435 ja Tyr398 väliin suoraan FAD:n eteen, mikä estää yhdistettä juurikaan vaihtamasta asentoa. Metoksi 7-sijainnissa ei kuitenkaan luo parempia vuorovaikutuksia kuin 6-sijainnissa, minkä takia inhibiitiomittauksissa 7-metoksin vaihto 6-metoksiksi nosti molekyylin **G** inhibiitiota. Yhdisteen 3-fenyylin hydrofobinen substituentti täyttää hyvin hydrofobisen taskun perän, mutta 6-metoksi ja tilan tuoma kääntymisen mahdollisuus voisi mahdollistaa eetterin hapelle dipoli-dipoli vuorovaikutuksia Ile199 kanssa ja kumariinin happien pääsyn lähemmäs Gln206.

### 5.3 Huomioitavia ongelmia

Inhibiitiomittauksissa osalla testiaineista oli havaittavissa huomattavaa inhibiition vähenemistä, kun taas jotkut säilyttivät aktiivisuutensa pienemmälläkin konsentraatiolla. Tämä ei kuitenkaan kerro paljoa aktiivisuutensa säilyttäneiden testiaineiden

paremmuudesta, sillä tutkimuksessa käytetyt konsentraatiot olivat molemmat liian korkeita. Useampaa ja pienempiä konsentraatioita käyttämällä ja rinnakkaisia mittauksia lisäämällä oltaisi saatu useampia ja luotettavampia tuloksia, joista olisi ollut paremmin nähtävillä testiaineiden varsinaiset toimintakonsentraatiot. Tuloksista olisi myös ollut tällöin mahdollista laskea  $IC_{50}$  arvoja, joita ei näiden mittausten perusteella voinut laskea.

Korkeita konsentraatioita käyttämällä saavutettiin kuitenkin varmoja inhibiitioprosentteja kaikista testiaineista, ja niiden avulla pystyi erottamaan aineiden selektiivisyyttä MAO-A:n ja MAO-B:n välillä. Konsentraatioiden pienentäminen olisi todennäköisesti johtanut testiaineiden **1**, **4**, **7** ja **8** kohdalla ennemmin tai myöhemmin aktiivisuuden laskemiseen. Testiaineista **3**, **5** ja **6** on vaikea sanoa missä vaiheessa inhibiitiot olisivat laskeneet, sillä ne eivät käytetyillä konsentraatioilla näyttäneet vielä heikkenemisen merkkejä.

Mittauksissa käytettiin myös ihmisen MAO entsyymien sijaan rotan MAO entsyymejä. Rotan ja ihmisen MAO:t ovat samantapaiset, sillä kummallakin entsyymit vastaavat dopamiinin hajotuksesta: jyrksijöillä siitä vastaa ennemmin MAO-A kun taas ihmisillä MAO-B (ks. yleiskatsaus Bortolato ja Shih, 2011). Rotan ja ihmisten MAO entsyymien taskuissakin on myös rakenteellisia eroja. Rotan tasku on ihmisen taskua huomattavasti pulleampi, lyhyempi, yhtenäisempi sekä tilavuudeltaan pienempi (ks. yleiskatsaus Youdim ym., 2006). Eri lajille tehdyistä mittauksista ei siis voi tehdä suoria oletuksia yhdisteiden toimimisesta ihmiseen.

Tutkimuksessa tutkittiin mitokondrion ulkokalvoon sitoutuvia MAO-entsyymien inhibiitiota, mutta *in vitro* -mittauksissa käytetyt entsyymit eivät olleet sitoutuneina kalvoon, mikä voi vaikuttaa entsyymien rakenteeseen ja siten myös yhdisteiden sitoutumiseen. Mittaukset olisi ollut hyvä tehdä myös esimerkiksi rotan seerumissa tai muuten luonnollista tilaa vastaavassa liuoksessa DMSO:n sijaan, vaikka muutkin ryhmät ovat tehneet tutkimuksensa DMSO:ta käyttäen (Matos ym., 2009a). Testiaineiden kanssa oli aluksi myös havaittavissa ongelmia liukoisuuden suhteen ja tästä syystä näytteillä kesti hetki ennen kuin niitä voitiin käyttää. Tämä ei nähtävästi ole harvinaista, sillä yli 100  $\mu$ M konsentraatiossa jotkin vastaavat yhdisteet voivat saostua (Matos ym., 2009a).

Seulonnan tulosten laajuuteen taas vaikuttaa Reaxys –tietokannan ja Sigma-Aldrichin kautta saatavien molekyylien laajuus ja hintataso. Telakointiin sen sijaan vaikuttaa taskusta poistetut kidevedet, jotka joiltain osin voivat määrätä substraattien paikan taskussa. Ilman kidevesiä yhdisteillä oli kuitenkin täysi vapaus tehdä erilaisia konformaatioita. Telakointituloksia kuitenkin rajoittaa itse taskun hydrofobisten ja fiilisten alueiden sijainnit.

Telakointituloksissa on myös otettava huomioon, että käytetyn proteiinin taskun rakenne ei välttämättä ole optimaalinen kaikille ligandimolekyyleille (Friesner ym., 2004). Kaikki molekyylit eivät välttämättä mahdu liian pieneen taskuun. Glide:lla on myös huomattu, että RMS virhe (engl. *root-mean-square error*), joka kertoo mallin arvion ja oikeasti mitatun arvon erosta, kasvaa ligandin liikkuvien sidosten määrän lisääntyessä. Yksi telakoinnin merkittävimmistä ongelmista liittyy pisteytysfunktion kyvyttömyyteen arvioida jokaisen ligandin mahdollisen konformaation sitoutumisvoimakkuutta riittävällä tarkkuudella. Tämän vuoksi telakointiohjelmat eivät pysty järjestelemään ligandeja paremmuusjärjestykseen tai edes erottelemaan aktiivisia ligandeja inaktiivisista molekyyleistä (Virtanen ja Pentikäinen, 2010). Matos ym. (2014) laskivat kymmenelle eri Protein Data Bankista hankitulle ihmisen MAO-B-entsyymien rakenteelle RMS -virheet vertaamalla telakointien ligandeille antamia laskennallisia tuloksia ligandien mitattuihin inhibiitioihin. Tässä tutkimuksessa käytetylle 2V61-rakenteelle RMS -virheen laskettiin olevan 1,38 Å, kun paras rakenne sai 0,26 Å ja huonoin 2,68 Å. Käytetty MAO-B rakenne ei siis välttämättä ollut luotettavin vaihtoehto.

## 5.4 Jatkossa

Tulevia yhdisteitä ajatellen kumariinin perusrakenne näyttää toimivan. Substraatteina voisi kokeilla kumariinin 6- ja 7-sijainneissa metyyliryhmiä. Halogeeninä voisi käyttää fluorin ja kloorin sijasta myös bromia. Bromin on havaittu parantavan ainakin kumariinin 8-sijainnissa ja 3-fenyyllissä yhdisteiden sitoutumista (Matos ym., 2010; Matos ym., 2014). Bromi onkin näitä kahta muuta halogeenia hitaampi reagoimaan, sillä se etsii stabiileimman mahdollisen sitoutumiskumppanin. Isompiakin substituentteja voi molekyylien A-G tulosten perusteella selvästi yrittää.

Kumariinien rakenne on selvästi mahdollinen pohja uusille MAO-inhibiittoreille. Kumariinit eivät myöskään ole ihmisille haitallisia sillä luonnosta löytyviä kumariineja on jo käytössä esimerkiksi hajuvesissä ja alkoholijuomissa (ks. yleiskatsaus Lake, 1999). Kumariinien käyttöä turvallisuutta on myös testattu eri annostelutavoilla ja niiden on havaittu olevan hyvin imeytyviä niin ihon kuin suoliston läpi. Lääkekäytössä täytyisi kuitenkin ratkaista kumariinien lyhyen puoliintumisajan ja maksassa tapahtuvan nopean hajotuksen ja erityksen tuoma ongelma.

Viimeaikaiset tutkimukset ovat osoittaneet kehitystä kumariinirakenteisten MAO-B-inhibiittoreiden suunnittelussa ja aktiivisuudessa (Delogu ym., 2011; Matos ym., 2014). Tulevaisuudessa näitä ja vastaavia inhibiittoreita voidaan tulla käyttämään niin tutkimuksissa kuin erilaisten sairauksien lääkehoidoissa. Ja vaikka nykyiset lääkkeet eivät vielä kykenekään estämään tai hidastamaan esimerkiksi Parkinsonin taudin etenemistä, tuovat uudet lääkkeet mukanaan myös mahdollisuuden tautia parantavien hoitojen kehitykseen (ks. yleiskatsaus Teo ja Ho, 2013). Tehokkaalla hoidolla voidaan myös antaa hermosairauksista kärsiville potilaille mahdollisuus nykyistä itsenäisempään ja parempaan elämään.



## LÄHDELUETTELO

- Bortolato, M. ja J.C. Shih. 2011. Behavioral outcomes of monoamine oxidase deficiency: preclinical and clinical evidence. *Int Rev Neurobiol.* 100:13-42.
- Bortolato, M., K. Chen ja J.C. Shih. 2008. Monoamine oxidase inactivation: from pathophysiology to therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 60:1527-1533.
- Binda, C., P. Newton-Vinsor, F. Hubálek, D.E. Edmondson ja A. Mattevi. 2002. Structure of human monoamine oxidase B a drug target for the treatment of neurological disorders. *Nat Struct Biol.* 9:1:22-26.
- Binda, C., J. Wang, L. Pisani, C. Caccia, A. Carotti, P. Salvati, D.E. Edmondson ja A. Mattevi. 2007. Structures of human monoamine oxidase B complexes with selective noncovalent inhibitors: safinamide and coumarin analogs. *J Med Chem.* 50:5848-5852.
- Carotti, A., C. Altomare, M. Catto, C. Gnerre, L. Summo, A. De Marco, S. Rose, P. Jenner ja B. Testa. 2006. Lipophilicity Plays a Major Role in Modulating the Inhibition of Monoamine Oxidase B by 7-substituted Coumarins. *Chem Biodivers.* 3:134-149.
- Chimenti, F., D. Secci, A. Bolasco, P. Chimenti, A. Granese, O. Befani, P. Trurini, S. Alcaro ja F. Ortuso. 2004. Inhibition of monoamine oxidases by coumarin-3-acyl derivatives: biological activity and computational study. *Bioorg Med Chem Lett.* 14:3697-3703.
- Delogu, G., C. Picciau, G. Ferino, E. Quezada, G. Podda, E. Uriarte ja D. Viña. 2011. Synthesis, human monoamine oxidase inhibitory activity and molecular docking studies of 3-heteroaryl coumarin derivatives. *Eur J Med Chem.* 46:1147-1152.
- Delogu, G.L., S. Serra, E. Quezada, E. Uriarte, S. Vilar, N.P. Tatonetti ja D. Viña. 2014. Monoamine Oxidase (MAO) Inhibitory Activity: 3-Phenylcoumarins versus 4-Hydroxy-3-phenylcoumarins. *ChemMedChem.* 9:1672-1676.
- Friesner, R.A., J.L. Banks, R.B. Murphy, T.A. Halgren, J.J. Klicic, D.T. Mainz, M.P. Repasky, E.H. Knoll, M. Shelley, J.K. Perry, D.E. Shaw, P. Francis ja P.S. Shenkin. 2004. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *J Med Chem.* 47:1739-1749
- Gaweska, H. ja P.F. Fitzpatrick. 2012. Structures and Mechanism of the Monoamine Oxidase Family. *Biomol Concepts.* 1;2(5):365-377.
- Hauptmann, N., J. Grimsby, J.C. Shih ja E. Cadenas. 1996. The Metabolism of Tyramine by Monoamine oxidase A/B Causes Oxidative Damage to Mitochondrial DNA. *Arch Biochem Biophys.* 335:2:295-304.
- Holt, A., D.F. Sharman, G.B. Baker ja M.M. Palcic. 1997. A Continuous Spectrophotometric Assay for Monoamine Oxidase and Related Enzymes in Tissue Homogenates. *Anal Biochem.* 244:384-392.
- Korb, O., T. Stutzle ja T.E. Exner. 2009. Empirical scoring functions for advanced protein-ligand docking with PLANTS. *J Chem Inf Model.* 49:84-96.
- Kraulis, P.J. 1991. MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J Appl Cryst.* 24:946-950.
- Lake, G.B. 1999. Coumarin Metabolism, Toxicity and Carcinogenicity: Relevance for Human Risk Assessment. *Food Chem Toxicol.* 37:423-453.
- Lehtonen, J.V., D.J. Still, V.V. Rantanen, J. Ekholm, D. Björklund, Z. Iftikhar, M. Huhtala, S. Repo, A. Jussila, J. Jaakkola, O. Pentikäinen, T. Nyrönen, T. Salminen, M. Gyllenberg ja M. Johnson. 2004. BODIL: a

molecular modeling environment for structure-function analysis and drug design. *J Comput Aided Mol Des.* 18(6):401-419.

Löhle, M. ja H. Reichmann. 2011. Controversies in Neurology: why monoamine oxidase B inhibitors could be a good choice for the initial treatment of Parkinson's disease. *BMC Neurol.* 11:112.

Matos, M.J., C. Terán, Y. Pérez-Castillo, E. Uriarte, L. Santana ja D. Viña. 2011. Synthesis and Study of a Series of 3-Arylcoumarins as Potent and Selective Monoamine Oxidase B Inhibitors. *J Med Chem.* 54:7127-7137.

Matos, M.J., D. Viña, C. Picciau, F. Orallo, L. Santana ja E. Uriarte. 2009a. Synthesis and evaluation of 6-methyl-3-phenylcoumarins as potent and selective MAO-B inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 19:5053-5055.

Matos, M.J., D. Viña, E. Quezada, C. Picciau, G. Delogu, F. Orallo, L. Santana ja E. Uriarte. 2009b. A new series of 3-phenylcoumarins as potent and selective MAO-B inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 19:3268-3270.

Matos, M.J., D. Viña, P. Janeiro, F. Borges, L. Santana ja E. Uriarte. 2010. New halogenated 3-phenylcoumarins as potent and selective MAO-B inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 20:5157-5160.

Matos, M.J., S. Vilar, V. García-Morales, N.P. Tatonetti, E. Uriarte, L. Santana ja D. Viña. 2014. Insight into the Functional and Structural Properties of 3-Arylcoumarin as an Interesting Scaffold in Monoamine Oxidase B Inhibition. *ChemMedChem.* 9:1488-1500.

Merritt, E.A. ja D.J. Bacon. 1997. Raster3D: photorealistic molecular graphics. *Methods in enzymology.* 277:505-524.

Robottom, B.J. 2011. Efficacy, safety, and patient preference of monoamine oxidase B inhibitors in the treatment of Parkinson's disease. *Patient Prefer Adherence.* 5:57-64.

Schapira, A.H. 2005. Present and future drug treatment for Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 76:1472-1478.

Son, S.Y., J. Ma, Y. Kondou, M. Yoshimura, E. Yamashita ja T. Tsukihara. 2008. Structure of human monoamineoxidase A at 2.2-Å resolution: the control of opening the entry for substrates/inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(15):5739-5744.

Surmeier, D. J. ja D. Sulzer. 2013. The pathology roadmap in Parkinson disease. *Prion.* 7:1:85-91.

Teo, K.C. ja S.-L. Ho. 2013. Monoamine oxidase-B (MAO-B) inhibitors: implications for disease-modification in Parkinson's disease. *Transl Neurodegener.* 2:19.

Virtanen, S.I. ja O.T. Pentikainen. 2010. Efficient virtual screening using multiple protein conformations described as negative images of the ligand-binding site. *J Chem Inf Model.* 50:1005-1011.

Youdim, M.B., D. Edmondson ja K.F. Tipton. 2006. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nat Rev Neurosci.* 7:295-309.

## LIITE 1: Koeasettelu ja liuosten valmistus

Koeasettelu. Abs 490nm. Kuopan kokonaistilavuus pidettiin 200 $\mu$ l:ssa korvaamalla puuttuvien reagenssien tilavuus K-fosfaattipuskurilla.

Tilavuus	Reagenssi	Loppukonsentraatio
50 $\mu$ l	kromogeeniliuos	
20 $\mu$ l	testiaine (100 tai 500 $\mu$ M) tai kontrolli 5 $\mu$ M	10 tai 50 $\mu$ M, 0,5 $\mu$ M
5 $\mu$ l	MAO-A/MAO-B	
x $\mu$ l	K-fosfaattipuskuri	
20 $\mu$ l	tyramiini 5 mM	0,5 mM

Taustamittaus otettiin, kun kuoppiin oli lisätty kaikki tarvittavat reagenssit, paitsi tyramiini, ja inkuboitu 30 minuutin ajan 37 °C:ssa. Taustamittauksen jälkeen näytteisiin lisättiin tyramiinia ja inkuboitin 60 minuutin ajan 37 °C:ssa, minkä jälkeen otettiin varsinaiset mittaukset. Absorbanssin mittaukseen käytettiin aallonpituutta 490nm, Abs<sub>max</sub> ~0,3-0,4. Mittauksissa käytettiin 0,1 sekunnin ja 1,0 sekunnin altistumisaikaa.

### K-fosfaattipuskuri

Kaliumfosfaattipuskuri (0,2M, pH 7.6) valmistettiin 0,4M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma) ja 0,4M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma, Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA) kantaliuoksista.

### Vanilliinihappo

Vanilliinihapon (Aldrich, Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA) liuotettiin K-fosfaattipuskuriin 1000mM pitoisuuteen, jota laimennettiin edelleen tarpeen mukaan.

### 4-aminoantipyriini

4-aminoantipyriini (Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA) liuotettiin K-fosfaattipuskuriin 500mM pitoisuuteen, jota laimennettiin edelleen tarpeen mukaan.

### Tyramiini

Tyramiini (Sigma, Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA) liuotettiin K-fosfaattipuskuriin 5000mM pitoisuuteen, jota laimennettiin edelleen tarpeen mukaan.

### Kromogeeniliuos

Kromogeeniliuoksen valmistuksessa käytettiin 1mM vanilliinihappoa, 500  $\mu$ M 4-aminoantipyriiniä ja valmistusta 8 U/ml HPR, 0,2M K-fosfaattipuskurissa (pH 7.6). Säilytys valolta suojattuna +2-8 °C:ssa.

### Klorgyliini

Klorgyliini valmistettiin liuottamalla valmiiseen DMSO-liuokseen 50mM pitoisuuteen, jota laimennettiin edelleen tarpeen mukaan. Säilytys +2-8 °C:ssa.

### Pargyliini

Pargyliini (Sigma, Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA) valmistettiin liuottamalla valmiiseen DMSO-liuokseen 500mM pitoisuuteen, jota laimennettiin edelleen tarpeen mukaan. Säilytys -20 °C:ssa pakastimessa.

### MAO-A ja MAO-B

Rotan MAO-A ja MAO-B olivat valmiiksi eristettyinä. Niiden aktiivisuuksiksi oli mitattu ja sopivaksi käyttömääräksi saatu 5 $\mu$ l.

### Testiaineet

Testiaineet TFD021, TFD022, TFD023, TFD024, TFD028, TFD031, TFD032, TFD033 ja TFD035 laimennettiin valmiiseen DMSO-liuokseen 100mM pitoisuuteen, jota laimennettiin edelleen tarpeen mukaan.