



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**MONOAMİN OKSİDAZ (MAO)
ENZİMLERİNİN HİDRÜR TRANSFERİ
MEKANİZMASI TEK BASAMAKLI MI
ÇOK BASAMAKLI MIDIR?**

KÜBRA ÇAKIR

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kimya Anabilim Dalı
Organik Kimya Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Safiye ERDEM

İSTANBUL, 2016



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**MONOAMİN OKSİDAZ (MAO)
ENZİMLERİNİN HİDRÜR TRANSFERİ
MEKANİZMASI TEK BASAMAKLI MI
ÇOK BASAMAKLI MIDIR?**

KÜBRA ÇAKIR

520813015

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kimya Anabilim Dalı
Organik Kimya Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Safiye ERDEM

İSTANBUL, 2016



**MARMARA UNIVERSITY
INSTITUTE FOR GRADUATE STUDIES
IN PURE AND APPLIED SCIENCES**



**IS THE HYDRIDE TRANSFER MECHANISM
OF MONOAMINE OXIDASE (MAO)
ENZYMES
SINGLE OR MULTIPLE STEP?**

KÜBRA ÇAKIR

520813015

MASTER THESIS

Department of Chemistry

Thesis Supervisor

Prof. Dr. Safiye ERDEM

ISTANBUL, 2016

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Öğrencisi Kübra ÇAKIR'ın "MONOAMİN OKSİDAZ (MAO) ENZİMLERİNİN HİDRÜR TRANSFERİ MEKANİZMASI TEK BASAMAKLI MI ÇOK BASAMAKLI MIDIR?" başlıklı tez çalışması, 03 Haziran 2016 tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Safiye ERDEM (Danışman)

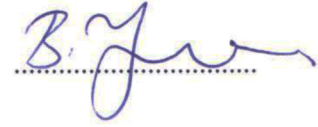
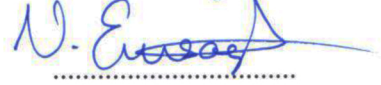
Marmara Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Vildan Enisoğlu ATALAY (Üye)

Üsküdar Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Başak Yüce DURSUN (Üye)

Marmara Üniversitesi

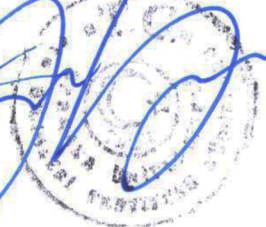
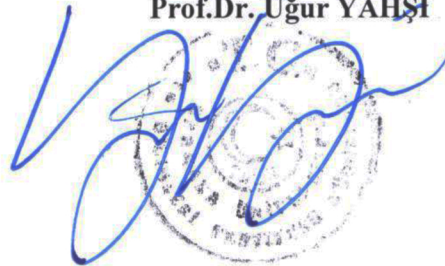


ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 13.06.2016 tarih ve 2016/13-02,... sayılı kararı ile Kübra ÇAKIR'ın Kimya Anabilim Dalı Organik Kimya Programında Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof.Dr. Uğur YAŞI



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca engin bilgi ve tecrübelerini esirgemeyerek maddi ve manevi her konuda yanımda olan sevgili danışman hocam Sayın Prof. Dr. Safiye ERDEM'e

Tez çalışmalarımın ilerlemesinde büyük katkıları olan ve her konuda değerli fikirleri ile bana yol gösteren değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Vildan Enisoğlu ATALAY'a

Lisans ve yüksek lisans öğrenimim boyunca elinden gelen her türlü desteğini gördüğüm değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ayşe OGAN'a

Görüş ve düşünceleri ile bana yol gösteren zor zamanlarımda yanımda olarak sorunları aşmamda yardımcı olan sevgili arkadaşım Habibe DÜLGER başta olmak üzere Şadan YURTÇU, Pınar ERZİNCAN ve diğer tüm çalışma arkadaşlarıma

Yüksek lisans öğrenimim boyunca yaşadığım her zorlukta varlığıyla beni cesaretlendiren başa çıkamadığım her durumda yanımda olan değerli arkadaşım Sait SARI'ya

Tüm hayatım boyunca maddi manevi her türlü desteğiyle yanımda duran ve umutsuzluğa kapılmadan karşıma çıkan engelleri aşmam için bana güç veren sevgili aileme

Bu tez çalışmasında 1001 kapsamındaki KBAG-113Z616 nolu projemize verdiği destekten dolayı TÜBİTAK'a çok teşekkür ederim.

Haziran, 2016

Kübra ÇAKIR

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
YENİLİK BEYANI.....	vi
SEMBOLLER.....	vii
KISALTMALAR.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
TABLO LİSTESİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1.Giriş ve Amaç	1
1.2. Genel Bilgiler	6
1.2.1. Enzimler.....	6
1.2.1.1. Flavin Koenzimler.....	7
1.2.2. Enzim Kataliz Reaksiyonları	8
1.2.3. Enzim İnhibisyonu	10
1.2.3.1. Geri Dönüşümlü İnhibisyon	10
1.2.3.2. Geri Dönüşümsüz İnhibisyon.....	11
1.2.3.3. Mekanizma Bazlı İnhibisyon	11
1.2.4. Monoamin Oksidaz (MAO).....	12
1.2.4.1. MAO Amin Oksitleme Mekanizmaları.....	16
1.2.4.1.1. Tek Elektron Transferi Mekanizması.....	17
1.2.4.1.2. Tek Basamaklı Hidrür Transferi Mekanizması.....	18
1.2.4.1.3. İki Basamaklı Hidrür Transferi Mekanizması.....	18
1.2.4.1.4. Polar Nükleofilik Mekanizma	19
1.2.4.1.5. Eşzamansız Tek Basamaklı Polar Nükleofilik Mekanizma	19
2. MATERYAL VE YÖNTEM	20
2.1 Kullanılan Yöntemler	20
2.1.1. Kompleks Sistemler için QM/MM Yöntemleri	20
2.1.2. Solvent Etkisinin Katılması	21

2.1.2.1. Gerçek (Explicit) Solvent Model	21
2.1.2.2. Temsili (Implicit) Solvent Model.....	22
2.1.2.3. Gerçek (Explicit) ve Temsili (Implicit) Solvent Etkisinin Hesaplamalara Birlikte Eklenmesi.....	23
2.1.3. Kümeleme (Cluster) Yaklaşımı	23
2.1.4. Yük Hesaplamaları (NBO)	24
2.2. Kullanılan Materyaller.....	24
2.2.1. Aktif Bölgenin Seçilmesi Ve Kullanılan Model Yapılar	24
2.2.2. ONIOM Seviyelerinin Belirlenmesi	26
2.2.3. Çalışılan Substratlar	27
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	29
3.1. MODEL I ile Gerçekleştirilen Çalışmalar: Nörotransmitter Aminlerin Oksidasyonunun Modellenmesi	29
3.2. MODEL IIa ile Gerçekleştirilen Çalışmalar.....	32
3.2.1. Modifiye Hidrür Transfer Mekanizması	33
3.2.2. N5 Yilid Oluşumu İnhibisyon mu Kataliz Basamağı mı?	40
3.2.3. Kovalent Geri Dönüşümlü İnhibitörlerin Mekanizma Bazlı Akılcı Tasarımı	42
3.2.4. Hidrür Transferi İle Proton Transfer Mekanizmalarının Karşılaştırılması	44
3.2.5. Büyük Model/Kovalent Bağlı Ve Bağısız FAD.....	48
3.3. Kuantum Kümeleme Yaklaşımı	50
3.4. MODEL IV İle MAO-A/MAO-B Serotonin/Dopamin Tepkimelerinin Kıyaslanması. 52	
4. GENEL DEĞERLENDİRME VE SONUÇ	55
KAYNAKLAR.....	57
ÖZGEÇMİŞ.....	72

ÖZET

MONOAMİN OKSİDAZ (MAO) ENZİMLERİNİN HİDRÜR TRANSFERİ MEKANİZMASI TEK BASAMAKLI MI ÇOK BASAMAKLI MIDIR?

Monoamin oksidaz A ve B dopamin, serotonin, adrenalın ve noradrenalin gibi nörotransmitter aminlerin oksidasyonundan sorumlu enzimlerdir. Bu enzimleri inhibe eden bileşikler Parkinson, Alzheimer depresyon gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılırlar. Literatürdeki birçok çalışmaya rağmen bu önemli enzimlerin amin oksidasyon mekanizmaları için bir uzlaşmaya varılamamıştır. Bu tez çalışmasında hidrür transferi mekanizmasına odaklanılmıştır.

Mekanizma hakkında bilinmeyen birçok konuya ışık tutmak için PM6 ve ONIOM (M06-2X/6-31+G(d,p):PM6) yöntemleri ile kuantum kümeleme yaklaşımı hesaplamaları gerçekleştirilmiştir. MAO-A ve MAO-B'nin reaksiyonları doğal substratlar ile (serotonin, dopamin, adrenalın ve noradrenalin) modellenerek giren kompleksi, geçiş konumu, ara ürün ve ürün kompleksi yapıları karakterize edilmiştir.

Tez çalışmasından elde edilen önemli sonuçlar şöyle özetlenebilir:

M06-2X/6-31+G(d,p) optimizasyonları hem proton transferi hem de hidrür transferinin birlikte bulunduğu hibrit bir mekanizmayı işaret etmektedir. Hibrit mekanizmanın tek basamaklı mı yoksa N5 yilidi üzerinden çok basamaklı mı olduğu substratın yapısına ve enzimin aktif bölgesinin büyüklüğüne bağlıdır. NBO yükleri N5 yilidinin enzimin aktivitesini geciktirdiğini ortaya çıkarmıştır. Bu bulgular zamana bağımlı geri dönüşümlü kovalent bağlı MAO inhibitörlerinin akılcı bir şekilde tasarımına yardımcı olabilirler.

Kuantum kümeleme yaklaşımı MAO'nun optimum büyüklükteki aktif bölge yapısında sistein amino asidinin FAD'a kovalent bağlı olmasının kataliz hızını 22 kat arttırdığını ortaya koymuştur.

ABSTRACT

IS THE HYDRIDE TRANSFER MECHANISM OF MONOAMINE OXIDASE(MAO) ENZYMES SINGLE OR MULTIPLE STEP?

Monoamine oxidase A and B are the enzymes catalyzing the oxidation of important neurotransmitter amines such as dopamine, serotonin, adrenaline and noradrenaline. Therefore, their inhibitors are used in the treatment of neurodegenerative diseases such as depression, Parkinson, Alzheimer. However, despite overwhelming efforts in the literature, amine oxidation mechanism of this pharmacologically important enzymes has been controversial. This study has focused on hydride transfer mechanism.

We employed full PM6 and ONIOM (M06-2X/6-31+G(d,p):PM6) calculations incorporated with the quantum cluster approach in order to provide new insights to several unsolved issues about the mechanism. The reactions of MAO-A and MAO-B with their natural substrates (serotonin, dopamine, adrenalin and noradrenaline) were modeled by optimizing and characterizing the reactant complex, transition states, intermediates and product complex structures.

The important outcomes of the study can be summarized as:

M06-2X/6-31+G(d,p) optimizations give rise to a hybrid mechanism exhibiting both proton transfer and the hydride transfer character. Whether the hybrid mechanism is concerted or stepwise through a N5-ylide depends on the nature of the substrate and the active site environment. NBO charges reveal that the formation of N5-ylide retards the enzyme activity. This finding can be quite useful in rational design of time-dependent reversible covalent inhibitors of MAO.

Quantum cluster approach reveals that the optimum active site model of MAO should contain the cysteine covalently bound to FAD, which increases the rate of catalysis by 22 times.

YENİLİK BEYANI

MONOAMİN OKSİDAZ (MAO) ENZİMLERİNİN HİDRÜR TRANSFERİ MEKANİZMASI TEK BASAMAKLI MI ÇOK BASAMAKLI MIDIR?

Monoamin oksidaz nörotransmitter aminlerin oksidasyonundan sorumlu dış mitokondriyal membran proteindir. MAO-A ve MAO-B olmak üzere %70 benzerliğe sahip, substrat ve inhibitör seçiciliklerinde farklılıklar gösteren iki farklı izoenzim yapısına sahiptir. Bu izoenzimlerin gereğinden az veya fazla aktivite göstermesi depresyon, Parkinson, Alzheimer gibi nörodejenaratif hastalıklara neden olur. Bu nedenle MAO-A ve MAO-B enzimlerinin amin oksitleme mekanizmaları büyük merak konusudur. Bilim dünyasında MAO mekanizmasını araştırmak üzere gerçekleştirilen hesaplamalı çalışmalar daha önceden grubumuz tarafından gerçekleştirilmiş, önerilen mekanizmalar hakkında destekleyici ve/veya karşıt deliller elde edilmiştir. Bu tez çalışması 4 önemli yenilik içermektedir:

- 1) Önerilen hidrür transferi mekanizmalarının aksine MAO amin oksitleme mekanizmasının 3 farklı basamak üzerinden ilerleyebilen çok basamaklı bir mekanizma olduğu ilk kez kanıtlanmıştır. Bu mekanizmaya göre kullanılan substratın ve/veya inhibitörün kararlılığına bağlı olarak mekanizma farklı yollar üzerinden ilerleyebilmektedir.
- 2) Modifiye edilen hidrür transferi mekanizmasında literatürde öne sürülen N5-bağlı araürünün aslında bir N5 yilidi olduğu ve mekanizmanın N5 yilidi üzerinden devam etmesi sonucunda enzimin aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir. Mekanizma içinde N5 yilidi oluşum basamağının yeni kovalent bağlı geri dönüşümlü mekanizma bazlı akılcı ilaç tasarımı için büyük bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.
- 3) Flavoenzimlerin kovalent bağlı olmasının enzim katalizine etkisi bilim dünyası için hala soru işaretleri barındırmaktadır. Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen hesaplamalar flavinin 8 α pozisyonundan proteine Cys397 amino asidi aracılığıyla kovalent bağlı olmasının enzim katalizini yaklaşık 22 kat hızlandırdığını ortaya koymuştur.
- 4) MAO enzim kataliz mekanizmasının proton transferi mekanizması mı yoksa hidrür transferi mekanizması mı olduğu en çok merak edilen konudur. Bu soruyu cevaplamak üzere gerçekleştirilen çalışmalar bu mekanizmanın aslında hem proton transferi hem de hidrür transferi mekanizması karakteri taşıyan bir hibrit mekanizma olduğunu ilk kez gözler önüne sermiştir.

Haziran, 2016

Prof. Dr. Safiye (SAĞ) ERDEM

Kübra ÇAKIR

SEMBOLLER

k	: Reaksiyon hız sabiti
ϵ	: Ekstinksiyon katsayısı
E_m	: Redoks Potansiyeli
E	: Enerji
E(2)	: Kararlılık Enerjisi
E_i, E_j	: NBO Fock matrisi diyagonal elemanları
F(i, j)	: NBO Fock matrisi diyagonal olmayan elemanları
q_i	: Donör orbitaldeki elektron sayısı
ΔE	: Reaksiyon enerjisi değişim
ΔG	: Reaksiyon serbest enerjisi değişim
ΔE^\ddagger	: Reaksiyon aktivasyon enerjisinin değişimi
ΔG^\ddagger	: Reaksiyon serbest aktivasyon enerjisinin değişim
Å	: Angstrom
αH	: Alfa hidrojen
αC	: Alfa karbon
R	: Bağ mesafesi
θ	: Bağ açısı

KISALTMALAR

MAO	: Monoamin Oksidaz
MAO-A	: Monoamin Oksidaz-A
MAO-B	: Monoamin Oksidaz-B
FAD	: Flavin Adenin Dinükleotid
FMN	: Flavin Mono Nükleotid
Fl_{ox}	: Okside Flavin
Fl⁻	: Semikinon Flavin
FlH⁻	: İndirgenmiş Flavin
DAAO	: D-Amino Asit Oksidaz
LSD1	: Lizin Spesifik Demetilaz 1
MTO	: N-metiltriptofan Oksidaz
GABA	: gama-Aminobütirik Asit
E	: Enzim
S	: Substrat
I	: İnhibitör
ES	: Enzim Substrat Kompleksi
EI	: Enzim İnhibitör Kompleksi
P	: Ürün
Ser	: Serotonin
PDB	: Protein Data Bank
SET	: Single Electron Transfer (Tek elektron transfer)
QM	: Kuantum Mekanik
MM	: Moleküler Mekanik
ONIOM	: Our Own N-layered Integrated MO and MM metod
YFT	: Yoğunluk Fonksiyoneli Teorisi
HF	: Hartree Fock
PM3	: Parametric Method 3
PM6	: Parametric Method 6

M06-2X	: Minnesota Fonksiyoneli 06 ile %54 HF Değiş-Tokuş Hibrit Fonksiyoneli
SCF	: Self-Consistent Field
SCRf	: Self-Consistent Reaction Field
PCM	: Polarizable Continuum Model
MO	: Moleküler Orbital
NBO	: Natural Bond Orbital
BD	: Bonding
LP	: Lone Pair
BD*	: Antibonding
LP*	: Antilone Pair
RY*	: Rydberg
Tyr	: Tirozin
Cys	: Sistein
Gln	: Glutamin
Gly	: Glisin
Phe	: Fenilalanin
Leu	: Lösin
Ile	: İzolösin
Thr	: Treonin
Lys	: Lizin
His	: Histidin
Val	: Valin

ŞEKİL LİSTESİ

SAYFA NO

Şekil 1.1. (a) Tek basamaklı hidrür transferi, (b) İki basamaklı hidrür transferi, (c) Polar nükleofilik A mekanizma, (d) Eşzamansız tek basamaklı polar nükleofilik mekanizma	2
Şekil 1.2. Riboflavin (Vitamin B2) yapısı	7
Şekil 1.3. Flavin koenziminin farklı oksidasyon dereceleri.....	8
Şekil 1.4. Enzim katalizli reaksiyon.....	8
Şekil 1.5. (a) MAO-A (2Z5X) (b) MAO-B (1S3E) enzim kristal yapıları	13
Şekil 1.6. MAO-A ve MAO- B enzimlerinin aktif bölge boşlukları ve aromatik kafes	15
Şekil 1.7. MAO'nun nörotransmitterleri oksitleme mekanizması	17
Şekil 1.8. Tek elektron transferi (SET) mekanizması	17
Şekil 2.1. ONIOM seviyelerinin tanımlanması.....	21
Şekil 2.2. Kuantum kümeleme yaklaşımına göre enzimin aktif bölge modelleri	25
Şekil 2.3. (a) MODEL IIa aktif bölge amino asitleri ve flavinde koordinantları dondurulmuş atomlar (b) ONIOM yönteminde kullanılan iki seviye	26
Şekil 2.4. (a) MODEL IV-shl (b) MODEL IV-lhl (c) MODEL IV-lhl-cys yapılarının üç boyutlu görüntüsü.....	27
Şekil 2.5. Çalışılan substratların üç boyutlu görüntüleri.....	28
Şekil 3.1. MODEL I (flavin+substrat) yapısındaki önemli atomların numaralandırılması	29
Şekil 3.2. Tarafımızdan önerilen, MAO katalizinde kovalent geri dönüşümlü inhibisyon basamağı (c yolu) içeren modifiye hidrür transferi için alternatif basamaklar (a, b).....	34
Şekil 3.3. Reaksiyon koordinatı boyunca MODEL-IIa için modifiye hidrür transferi mekanizmasına ait relatif Gibbs serbest enerji değerleri (kkal/mol).....	35
Şekil 3.4. MAO'nun serotonin ile oksidasyonundan ONIOM(M062x/6-31+G(d,p):PM6) yöntemiyle reaksiyon koordinatı boyunca MODEL IIa-shl yapısı ile elde edilen optimize yapılar.....	36
Şekil 3.5. MODEL IIa-shl için CPCM/M062X/6-31+G(d,p)//PM6 metodu ile gerçekleştirilen hesaplamalardan elde edilen flavin halkası ve serotonin'in NBO toplam yükü ile önemli atomlara ait NBO yüklerinin reaksiyon koordinatı boyunca değişimi.....	42
Şekil 3.6. 5-(aminometil)-3-(4-metoksifenil)-2-oksazolidinon inaktivatörünün ONIOM (M062x/6-31+G(d,p):PM6) yöntemiyle MODEL IIa-shl için elde edilen PC_{inv} ve $N5_{yl}$ optimize yapıları.....	44

Şekil 3.7. MAO'nun amin oksidasyon mekanizmasında substrattan FAD'e elektronların saat yönünde ve saat yönün tersine hareketi..... 45

Şekil 3.8. MAO'nun serotonin ile oksidasyonunda hız belirleme basamağının MODEL IV-shl için M06-2X/6-31+G(d,p):PM6 metodu ile elde edilen optimize geometri yapıları. 49



TABLO LİSTESİ

SAYFA NO

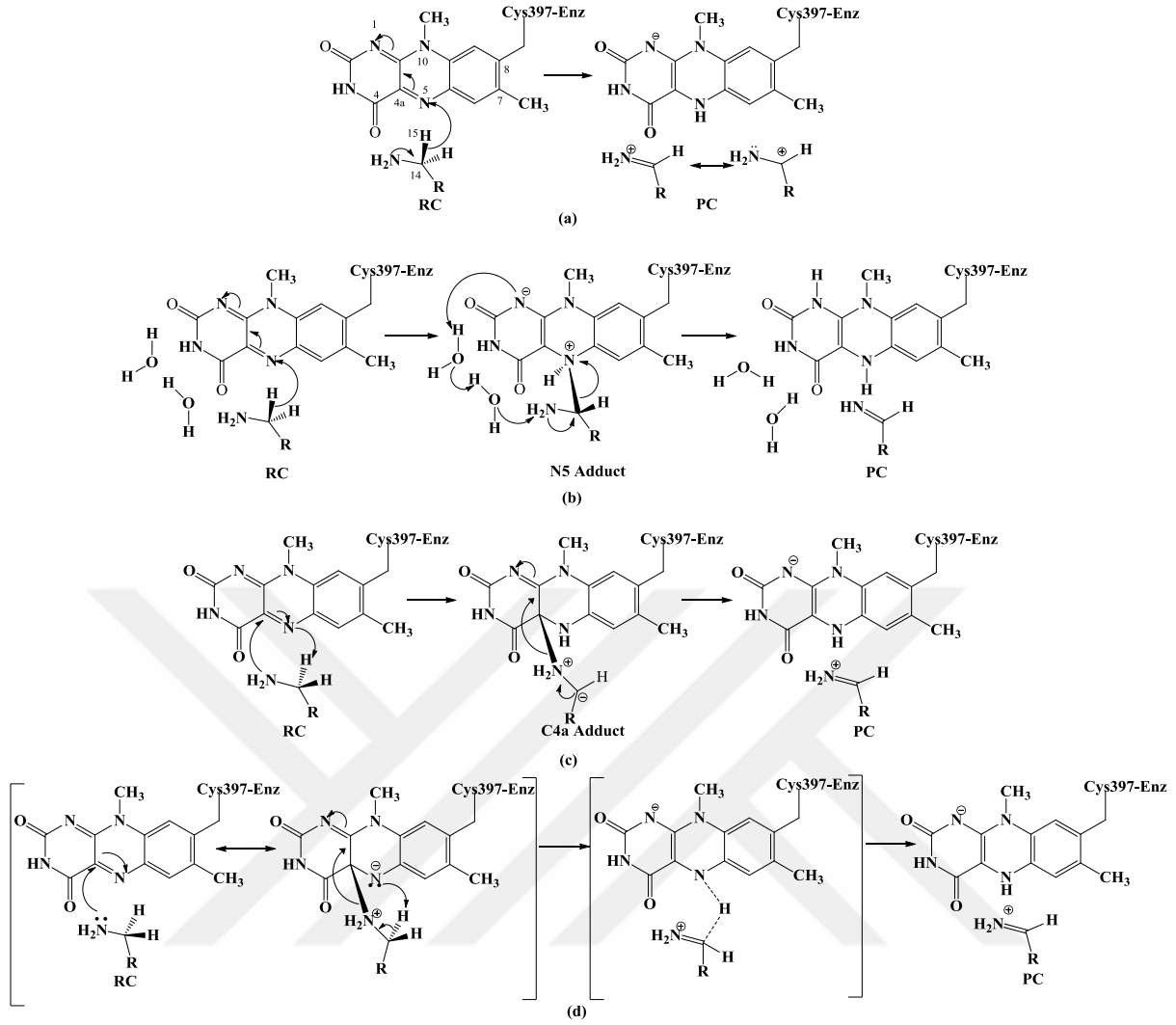
Tablo 3.1. Nörotransmitterlerin MODEL I için PM6 yöntemi ile modellenen polar nükleofilik mekanizmasına ait $\Delta G1^\ddagger$:1. Basamağın Gibbs aktivasyon enerjisi, $\Delta G2^\ddagger$: 2. Basamağın Gibbs aktivasyon enerjisi, ΔG Reaksiyonun Gibbs serbest enerjisi, ZPE düzeltilmiş 1. aktivasyon enerjisi ($\Delta E1^\ddagger$), ZPE düzeltilmiş 2. aktivasyon enerjisi ($\Delta E2^\ddagger$) ve ZPE düzeltilmiş enerjileri (ΔE) (kkal/mol)	30
Tablo 3.2. Nörotransmitterlerin MODEL I için PM6 yöntemi ile modellenen hidrür transfer mekanizmasına ait Gibbs serbest aktivasyon enerjileri (ΔG^\ddagger), ZPE düzeltilmiş aktivasyon enerjileri (ΔE^\ddagger), reaksiyonların Gibbs serbest enerjileri (ΔG) ve ZPE düzeltilmiş enerjileri (ΔE) (kkal/mol)	30
Tablo 3.3. Nörotransmitterlerin MODEL I için PM6 yöntemi ile elde edilen geçiş konumu (TS) yapılarına ait önemli bağ uzunlukları (Å) ve ürün/araürün tercihleri (PC/N5-ADD/C4a-ADD).....	32
Tablo 3.6. MODEL IIa-shl geçiş konumu üzerine M062X/6-31G(d,p)/(M062X/6-31+G(d,p):PM6) metodu ile gerçekleştirilen NBO ikinci dereceden pertürbasyon teorisi analizinde önemli donör-akseptör etkileşim enerjileri.	47
Tablo 3.7. MODEL IIa-shl ve MODEL IV-shl yapıları için kovalent bağlı(c-FAD) ve kovalent bağısız (nFAD) mutant modeller için relatif Gibbs serbest enerji hesaplamaları ΔG (kkal/mol).	49
Tablo 3.8. PM6 ve ONIOM (M062X/6-31+G(d,p):PM6) yöntemleriyle optimize edilmiş model yapıların relatif gibbs serbest enerji (ΔG), ZPE düzeltilmiş enerji (ΔE) değerleri (kkal/mol) ve $\alpha C-N5$ atomları arası mesafeler(Å)	51
Tablo 3.9. MAO-A enziminin serotonin ve dopamin nörotransmitterlerinin hidrür transferi mekanizmasına ait Gibbs serbest aktivasyon enerji (kkal/mol) (ΔG^\ddagger) ve ZPE düzeltilmiş enerji (ΔE^\ddagger) değerleri (kkal/mol) , $\alpha C-N5$ ve N11-C4a (Å) mesafeleri.....	52
Tablo 3.10. MAO-B enziminin serotonin ve dopamin nörotransmitterlerinin hidrür transferi mekanizmasına ait Gibbs serbest aktivasyon enerji (kkal/mol) (ΔG^\ddagger) ve ZPE düzeltilmiş enerji (ΔE^\ddagger) değerleri (kkal/mol) , $\alpha C-N5$ ve N11-C4a (Å) mesafeleri.....	54

1. GİRİŞ

1.1.Giriş ve Amaç

Monoamin oksidaz (E.C 1.4.3.4; MAO) biyolojik aminleri oksitleyerek parçalayan bir flavo enzimdir (Colibus vd., 2005). MAO-A ve MAO-B olmak üzere %70 oranında birbirine benzeyen iki izoenzimi bulunmaktadır (Binda vd., 2002). Her iki enzimin benzer oksitleme mekanizmalarına sahip olduğu düşünülmekle beraber, substrat tercihleri, immünolojik özellikleri, doku dağılımları, inhibitör özgünlüğü ve amino asit dizilimleri bakımından birbirlerinden ayrılırlar. MAO-A, seçici olarak serotonin, epinefrin, norepinefrini oksitler ve yaygın olarak kullanılan inhibitörü klorglindir (Colibus vd., 2005). MAO-B'nin substratları dopamin, benzilamin, fenetilamin, inhibitörü ise (R)-deprenildir (Rinne, 1978; Kalgutkar vd., 2001).

Yıllardır MAO-A ve MAO-B enzimlerinin amin oksidasyon mekanizmasının aydınlatılması için büyük uğraşlar verilmiştir. MAO'nun amin oksitleme mekanizması hakkında literatürde mekanizmaya bağlı inaktivasyon, izotopik etiketleme, araürünleri tespit edebilme, kinetik izotop etkileri, mutasyon incelemeleri gibi deneysel yöntemleri kapsayan çok sayıda yayın mevcut olmasına rağmen, araştırmacılar mekanizma üzerinde henüz bir uzlaşmaya varamamışlardır (Edmondson vd., 2007; Chajkowski-Scarry ve Rimoldi, 2014). MAO katalizi üzerine çelişkili deneysel bulgular, deneylerde doğrudan gözlemlenemeyen moleküler düzeyde detayları incelemeyi amaçlayan teorik çalışmaları gerekli kılmıştır. MAO mekanizması üzerine ilk hesaplamalı çalışma, FAD ve bir seri *p*-süstitüe benzilamin türevleri arasındaki reaksiyon için PM3 ve B3LYP/6-31G(d) metotlarını kullanan Erdem vd. (2006) tarafından sunulmuştur. Oksidasyon mekanizmasında substrattan bir proton ve iki elektronun flavine transferi gerçekleşmektedir. Bu transfer için literatürde Tek Elektron Transferi (Single Electron Transfer-SET) mekanizması (Silverman, 1992; Silverman, 1995; Lu vd., 2002) hidrür transferi mekanizması (Ralph vd., 2007; Fitzpatrick, 2004; Fitzpatrick, 2010) ve polar nükleofilik mekanizma (Miller ve Edmondson, 1999; Edmondson vd., 2004) gibi çeşitli oksidasyon mekanizmaları önerilmiştir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. (a) Tek Basamaklı Hidrür Transferi, (b) İki Basamaklı Hidrür Transferi, (c) Polar Nükleofilik A Mekanizma, (d) Eşzamansız Tek Basamaklı Polar Nükleofilik Mekanizma

Tek elektron transferi (SET) mekanizması amin oksidasyonlarında ve MAO-B'de mekanizma-bazlı çeşitli inhibitörlerin birçok halka açılması tepkimeleri için önerilen SET kimyasına dayanmaktadır (Silverman ve Ding, 1993). Bu mekanizmaya karşı sunulan görüşlerin en bilineni; MAO-A ve MAO-B için katalitik öneme sahip radikal ara ürünün saptanmasındaki başarısızlıktır (Edmondson vd., 2007). Grubumuz tarafından (Erdem ve Büyükmenekşe, 2011) ve son dönem diğer gruplar tarafından gerçekleştirilen çalışmaların (Vianello vd., 2012; Abad vd., 2013) hesaplamalı sonuçları da SET mekanizmasına karşı kanıtlar sunmuştur. Bu sebeple yakın zamandaki çalışmaların odağında geriye kalan diğer iki mekanizma yer almaktadır.

Polar nükleofilik mekanizmaya göre, flavin üzerindeki C4a üzerine amin azotundan gelen bir çift elektron ile C4a atomu eksi yük ile yüklenirken N5 atomunun nükleofilik saldırmasıyla

aminin α C'u üzerinden pro-R hidrojeni proton olarak kopar. İkinci basamakta ise oluşan araürün indirgenmiş flavin ve iminyum katyonu vermek üzere ayrışır (Şekil 1.1.c). Bu mekanizma Miller ve Edmondson (1999) ve Edmondson vd. (2004), tarafından MAO-A'nın indirgeyici yarı reaksiyonu üzerinde bir seri *p*-süstitüe benzilamin türevlerinin yapı-aktivite ilişkilerine dayanarak önerilmiş ve modelleme çalışmalarımız tarafından desteklenmiştir (Erdem vd., 2006; Akyüz vd., 2007). Elektron çekici gruplar ile reaksiyon hızının iyileştirilmesi, Edmondson vd. (2004) tarafından önerilen polar nükleofilik mekanizmayı desteklemiştir. Ancak, önerilen mekanizmaya göre C4a-N11 arasında bağ oluşması sonucu elde edilen araürünü yoğunluk fonksiyonel teorisi metotları ile optimize edilememiştir.

MAO-A ve MAO-B'nin aktif bölgelerindeki benzerlikler göz önüne alındığında, MAO-B için de aynı mekanizmanın geçerli olduğu varsayılmıştır. Daha sonra, D-aminoasit oksidaz (DAAO) için kabul edilen ve N-metiltryptofan oksidaz (MTO) ve lizin-spesifik demetilaz 1 LSD1 enzimleri için uygun görülen doğrudan hidrür transfer mekanizmasının, bu enzimlere benzerliği nedeniyle MAO için de düşünülmesi gerektiği birçok araştırmacı tarafından önerilmiştir (Fitzpatrick, 2010; Kay vd., 2007; Can, 2007). Bu önermeye göre, amin azotundan C14-N11 bağına elektron aktarımı, herhangi bir ara ürün oluşmaksızın, α C'dan flavin N5 atomuna hidrür göçünü kolaylaştırmaktadır (Şekil 1.1.a). Erdem vd. (2006), YFT (B3LYP/6-31G(d)) yöntemleri ile araürünün elde edilememesi sonucunda nükleofilik katılma, eliminasyon ve proton transferinin eşzamansız tek-basamaklı (asynchronous concerted) şekilde gerçekleşebileceğini önermiştir. Bunu izleyen QM/MM çalışması (Akyüz vd., 2007), bu ilk çalışma ile uyum içindedir. Aslında C4a araürününün eksikliği, DAAO, MTO ve LSD1 gibi diğer flavoenzimlerin mekanizmaları üzerine çalışan birçok araştırmacının önerdiği gibi, tek basamaklı hidrür transferi mekanizmasına işaret etmektedir (Ralph vd., 2007; Can, 2007; Fitzpatrick, 2010). Daha sonra, Vianello vd. (2012) tarafından MAO-B ile dopamin oksidasyonuna kuantum kümeleme hesapları uygulanmış ve N5-bağlı araürün (N5 Adduct) oluşumuna dayanan iki basamaklı hidrür transferi mekanizması önerilmiştir (Şekil 1.1.b). Aynı zamanda grubumuz tarafından Akyüz ve Erdem (2013), benzilamin ve feniletilamin substratları kullanılarak ONIOM hesaplamaları (yüksek katman için WB97XD, CAM-B3LYP, M06-2X, B3LYP fonksiyonelleri ile) gerçekleştirilmiştir. Her iki MAO izoformunun da aktif bölgeleri hesaplamalara ilk kez tamamen dahil edilmiştir. Sonuçların N5 araürününün sadece MAO-B'de oluşabildiğini göstermesi, MAO-A ve MAO-B için kısmen farklı hidrür transfer mekanizmaları olduğuna işaret etmektedir. Bundan bağımsız olarak Orru vd. (2013) tarafından yapılan çalışma da MAO-A ve MAO-B'nin aynı mekanizmayı izlediklerine dair

temel varsayımı sorgulamıştır. pH 9'daki yapı-aktivite ilişkileri, MAO-A'nın proton transferine (polar nükleofilik) dair aktivite gösterirken, MAO-B'nin ise hidrür transferine dair kinetik özellikler gösterdiğini kanıtlamaktadır. Öte taraftan Repič vd. (2014a) her iki aktif bölgede de elektrostatik düzenlenmelerin benzer olduğunu, bu yüzden MAO-A ve MAO-B'nin farklı kimyasal mekanizmalara sahip olabilmesinin mümkün olmadığını söylemişlerdir (Repič vd., 2014b). Repič ve arkadaşları ayrıca insan MAO-B enziminin tamamını göz önüne alarak, dopamin yıkımına ait hidrür transfer basamağı için değerlik bağ simülasyonları uygulamışlardır (Repič vd., 2014a). Diğer yandan Abad ve arkadaşları da benzilamin substratı ile MAO-B enziminin tamamını kullanarak QM/MM hesaplamaları (QM hesaplamaları için BP86 seviyesinde ve MM hesaplamaları için CHARMM27 seviyesinde) uygulamışlardır (Abad vd., 2013). Abad vd. (2013) sonuçlarını, en başta Erdem ve arkadaşları tarafından önerilen eşzamansız tek basamaklı polar nükleofilik mekanizma lehine yorumlamışlardır (Şekil 1.1.d). Çok yakın zamana ait bir hesaplamalı çalışmada, Zenn vd. (2015) MAO-A enziminin çevresindeki proteinin, mekanizmanın polar nükleofilik karakterini MAO-B enzimine göre daha çok güçlendirdiğine dair bulgular elde etmişlerdir. Bu sonuç, Orru vd. (2013) kinetik deneyleriyle uyum içindedir, ancak iki izoformdaki elektrostatik düzenlenmenin benzerliğine dair bulgular (Repič vd., 2014a) ile çelişmektedir. Çok yakın zamanda, Zapata vd. (2015) benzilamin, *p*-nitrobenzilamin ve fenilettilamin substratları ile MAO-B enzimi için kuantum kümeleme yaklaşımını kullanmışlardır. *p*-nitrobenzilamin polar nükleofilik mekanizmasına, benzilamin ve fenilettilamin hidrür transferi mekanizmasına benzer sonuçlar vermiştir.

Bugüne kadar elde edilen tüm deneysel veriler ve son yıllardaki teorik çabalara rağmen, MAO mekanizması hakkında hâlâ soru işaretleri vardır (Chajkowski-Scarry ve Rimoldi, 2014).

Bu tezin amacı, bugüne kadar yapılan teorik ve deneysel çalışmaların ışığında nörotransmitter aminlerin MAO katalizli oksidasyon mekanizmasına açıklık getirmektir. Bu bağlamda, şu soruların cevapları araştırılmıştır:

- 1) MAO enzimleri nörotransmitter aminleri proton transferi ile mi yoksa hidrür transferi ile mi oksitlemektedir? Veya, ilginç bir şekilde, her iki mekanizmanın da birlikte olabilme ihtimali var mıdır? Mekanizmanın detayları ve takip ettiği mekanizma yolları nelerdir? Tek basamaklı mıdır yoksa bazı araürünler oluşmakta mıdır?
- 2) Katalizleme tepkimesinden sorumlu olan flavin kofaktörünün protein iskeletine kovalent bağlı olmasının (diğer birçok flavoenzimden farklı olarak) işlevi nedir?

Katalizleme hızı açısından bir önemi var mıdır? Hangi mekanizmanın geçerli olduğunu belirlemede bir rol oynamakta mıdır?



1.2. Genel Bilgiler

1.2.1. Enzimler

Enzimler biyolojik sistemlerde katalizör görevi gören sentetik veya inorganik katalizörlere göre daha üstün katalizleme yeteneğine sahip özel makromoleküllerdir. Substratlarına karşı yüksek derecede seçiciliğe sahip olup kimyasal reaksiyonları hızlandırırlar ve sulu çözeltilerde belirli sıcaklık ve pH şartları altında faaliyet gösterebilirler (Nelson ve Cox, 2012).

Enzimler bütün biyokimyasal prosesin merkezinde yer alırlar ve besin maddelerini ayrıştıran, kimyasal enerjiyi dönüştüren, biyolojik makromolekülleri yapıtaşlarından oluşturan reaksiyonları katalizlerler. Enzim çalışmaları pratikte çok büyük öneme sahiptir. Bazı hastalıklar, özellikle kalıtsal genetik bozukluklar, çeşitli enzimlerin eksikliğinden veya yokluğundan kaynaklanırken, bazı hastalıklar ise çeşitli enzimlerin aşırı aktivitesi sonucu ortaya çıkar.

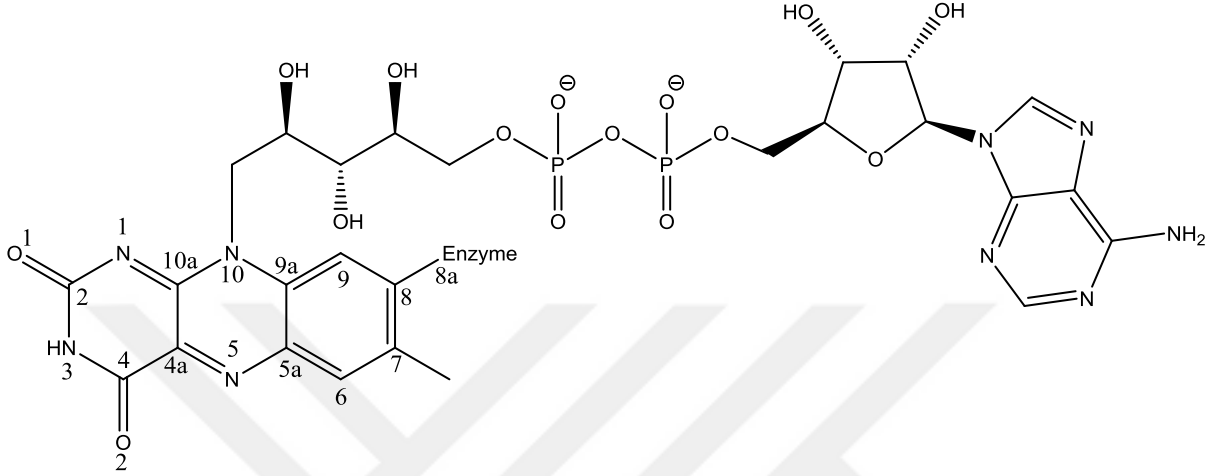
Enzimatik kataliz bütün yaşayan sistemler için olmazsa olmazdır. Biyolojik sistemlerde, çoğu biyolojik molekül hücre şartları olan nötr pH'ta, ılımlı sıcaklıklarda ve sulu ortamlarda oldukça kararlı olduğundan bu sistemlerde katalizlenemeyen reaksiyonlar yavaş gerçekleşme eğilimi gösterirler. Ayrıca, birçok bilindik, kararsız ara ürünlerin oluşumu veya iki farklı molekülün özel bir biçimde çarpışması gibi kimyasal prosesler hücre ortamında elverişsizdir veya mümkün olmamaktadır. Bu nedenle enzimler söz konusu reaksiyonların daha hızlı bir şekilde oluşması için ortam yaratmaktadırlar.

Bazı enzimler aktivite gösterebilmek için “kofaktör” adı verilen farklı kimyasal bileşiklere ihtiyaç duyarlar. Kofaktörler, Fe, Mg, Mn veya Zn gibi inorganik iyonlar olabileceği gibi çeşitli organik bileşikler de olabilirler. Enzimin aktivitesini gösterebilmek için ihtiyaç duyduğu organik veya metalorganik bileşiklere ise “koenzim” adı verilir. Bazı enzimler hem inorganik hem de organik kofaktörlere ihtiyaç duyarlar.

Enzim katalizli bir reaksiyonun belirleyici özelliği, enzimin katalizleme reaksiyonunu gerçekleştirdiği enzimin “aktif bölgesi” olarak adlandırılan bir kısmında oluşuyor olmasıdır. Aktif bölgenin yüzeyi substitüentler taşıyan ve substrata bağlanıp, onun kimyasal değişimini katalizleyen amino asit parçalarıyla sarılıdır. Katalizleme reaksiyonu sırasında aktif bölge substratı çevreler ve onu çözeltiliden izole eder.

1.2.1.1. Flavin Koenzimler

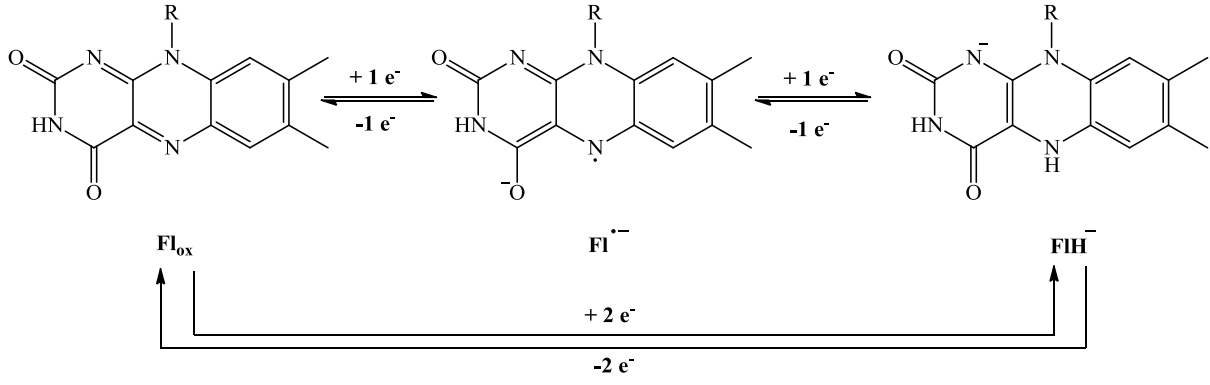
Flavinler flavoprotein olarak sınıflandırılan enzimlerde oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarında görev alan Riboflavin [7,8-dimethyl-10-(1-D-ribityl)isoalloxazine, vitamin B2]'den türeyen koenzimlerdir (Mack ve Grill, 2006). (Şekil 1.2) Flavin mono nükleotid (FMN) ve flavin adenin dinükleotid (FAD) riboflavinin biyolojik aktif formlarıdır.



Şekil 1.2. Riboflavin (Vitamin B2) yapısı

Flavin koenzim yapısının biyolojik aktivite gösteren kısmı izoalloksazin halkasıdır. Yüksek konjugasyona sahip izoalloksazin halkası muhteşem bir elektron akseptörüdür ve bu sayede kuvvetli redoks özellik gösterir. Flavinler tek seferde bir elektron ya da eş zamanlı olarak iki elektron kabul edebilirler ve bunun sonucunda koenzimin okside form (Fl_{ox}), semikinon form ($Fl^{\cdot-}$) ve indirgenmiş form ($FlH^{\cdot-}$) olmak üzere üç farklı oksidasyon derecesi oluşabilir (Silverman ve Holladay, 2014) (Şekil 1.3).

Flavin koenzimleri enzimlerin Histidin (Chlumsky vd., 1998) ya da Sistein (Kearney vd., 1978) kalıntılarına C-6 veya C-8a pozisyonlarından kovalent bağlı olarak bulunabileceği gibi kovalent bağısız (Doukyu, 2009) olarak da bulunabilirler. Fakat enzimin kovalent bağlı olup olmamasının enzim aktivitesi üzerine etkisi tam olarak açıklık kazanmamıştır.



Şekil 1.3. Flavin koenziminin farklı oksidasyon dereceleri (Silverman ve Holladay, 2014).

1.2.2. Enzim Kataliz Reaksiyonları

Canlı vücudunda gerçekleşen pek çok reaksiyon termodinamik olarak tercih edilse de kinetik olarak çok yavaştır. Bu sebeple evrim sürecinde bu reaksiyonların katalizlenmesi için özelleşmiş katalizörler olan enzimler ortaya çıkmıştır. Enzimler substratların ürüne dönüşüm mekanizmalarından sorumludurlar. Substratlar (S) enzimlerin (E) aktif bölgelerine bağlanarak enzim-substrat kompleksi (ES) oluştururlar ve daha sonra bağlanmış substratlar ürünlere (P) dönüşerek ayrılırlar. Enzimler aktivitelerini devam ettirebilmek için yükseltgenerek işlevlerini geri kazanırlar (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Enzim katalizli reaksiyon

En önemli enzim kataliz mekanizmaları yakınlık etkisi, nükleofilik (kovalent) kataliz, genel asit-baz katalizi, elektrostatik kataliz, çözünürleştirme ve germe-çekmedir. Bu etkiler geçiş konumunun kararlılık kazanmasına ya da girenlerin kararsızlaşmasına yardımcı olarak reaksiyonun aktivasyon bariyerini düşürürler (Silverman ve Holladay, 2014).

Yakınlık etkisi, substrat ile enzimin aktif bölgesinde bulunan reaktif grupların uyumuna dayanmaktadır. Bu uyum yardımıyla substrat enzimin aktif bölgesine yakın bir noktada tutunur ve çevrilme-düzenlenmeler ile substratın entropisinde azalma meydana gelir. Substrattaki bu entropik azalma substratın enzime bağlanma enerjisi ile dengelenir ve entalpide azalma meydana gelir. Lightstone ve Bruice (1996) tarafından MM3 yöntemi ile gerçekleştirilen teorik hesaplamalar sınırlı dönmenin reaksiyon aktivasyon enerjisini düşürdüğünü göstermiştir.

Bazı enzimlerin aktivitesinde, aktif bölgede bulunan kofaktör ya da nükleofilik amino asit kalıntıları görev alırlar. Nükleofilik kataliz reaksiyonlarında enzimin nükleofilik kısmı substratın elektrofilik kısmına atak yaparak kovalent bağ oluşturur ve reaksiyonun daha hızlı gerçekleşmesini sağlar. En temel aktif bölge nükleofilleri sistein üzerindeki tiyol grubu, serin ve treonin üzerindeki hidroksil grupları, histidin üzerindeki imidazol halkası, lizin üzerindeki amino grubu ve aspartik asit ve glutamik asit üzerindeki karbonil gruplarıdır.

Genel asit-baz katalizi, proton transferine dayanır ve reaksiyonun hızı ile özgünlüğünde etkili rol oynar. Enzim substratın elektrofilik veya nükleofilik karakterini proton transferi ile artırır ve reaksiyonun hızlanmasını sağlar. Blow ve arkadaşlarının (1969) α -kimotripsin ile gerçekleştirdiği çalışmaya göre yükün el değiştirmesi olarak adlandırılan bir dizi nükleofilik ataklar sonucu aktif bölgede pKa değerinin yükselmesi ile reaksiyon hızının arttığı gözlemlenmiştir.

Elektrostatik kataliz, aktif bölgede bulunan iyonik veya polar grupların substratta karşıt yük oluşturması sonucu geçiş konumunun kararlı girenlerin ise kararsız hale gelmesi ile reaksiyon aktivasyon bariyerinin düşmesine sebep olmaktadır. Serin proteaz subtilisin enzimi ile aktif bölge proton verici amino asitlerinin (serin-221, histidin-64 ve aspartat-32) alanin amino asit kalıntısıyla değiştirilmesi sonucunda hızın 2×10^6 kat yavaşladığı gözlemlenmiştir (Carter ve Wells, 1988).

Girenlerin kararlılığının bozulması çözünürleştirme ile de gerçekleştirilebilir. Enzime substratın bağlanması sırasında aktif bölgenin yüklü gruplarından su moleküllerinin çıkarılması ile oluşmaktadır. Su moleküllerinin çıkarılması sonucunda substrat suya göre daha düşük dielektrik ortama maruz kalır ve substrat üzerindeki yüklü gruplar kararsız hale getirilir. Suyu göre daha düşük dielektrik ortamda elektrostatik etkileşimler çok daha fazla olacağından pozitif ve negatif yüklerin var olması reaksiyonun geçiş konumu sırasında oluşan yükleri daha kuvvetli stabilize edecektir.

Organik kimyada germe ve çekme moleküllerin reaktivitelerinde önemli rol oynar. Epoksitlerin diğer esterlere göre reaktivitesinin çok daha yüksek olması bu olaya bağlıdır. Siklik fosfat ester hidrolizi de bu durumu açıklayan bir diğer örnektir (Covitz ve Westheimer, 1963). Eğer enzim kataliz sırasında germe ve çekme uygulanabilirse enzimatik reaksiyon çok hızlanacaktır. Bu etki enzimde yüksek aktivasyona, substratta meydana gelirse substratın giren konumu enerjisinin artmasına sebep olacaktır. Induced fit hipotezine (Koshland, 1958) göre enzim substratı bağlayabilmek için uygun pozisyonda olmak zorunda değildir. Substrat enzime yaklaştıkça substrat üzerindeki çeşitli gruplar aktif bölgede konformasyonel değişime

uğrarlar ve enzimin kararlılığını bozarak (germe ve çekme) düşük katalitik formdan yüksek katalitik forma geçmesini veya katalizde yer alan aktif bölge gruplarının düzgün bir sıraya girmesini sağlayarak enzim katalizini hızlandırırlar.

1.2.3. Enzim İnhibisyonu

Birçok hastalık veya hastalıkların ilk belirtileri özel bileşiklerin eksiklik ya da fazlalığından ileri gelir. Bu özel bileşiklerin eksikliği veya fazlalığı enzim inhibisyonunun bir sonucu olabilir. Enzim inhibisyonu çeşitli bileşiklerin enzime bağlanarak çok kararlı ES kompleksi oluşturması sonucu enzimin aktivasyonunun yavaşlaması ya da tamamen durması olayıdır. İki tip inhibisyon çeşidi vardır: geri dönüşümlü inhibisyon, geri dönüşümsüz inhibisyon.

1.2.3.1. Geri Dönüşümlü İnhibisyon

Geri dönüşümlü inhibisyon; yarışmalı (competitive), yarı yarışmalı (uncompetitive) ve yarışmasız (non competitive) inhibisyon olmak üzere üç gruba ayrılır.

a)Yarışmalı inhibisyonda genellikle gerçek substrata benzeyen inhibitör (I) enzimin aktif bölgesine bağlanmak için substrat ile yarışır. İnhibitor substrat gibi enzime bağlanarak EI kompleksi oluştururlar fakat reaksiyon gerçekleşmez. Böylelikle substratın ürüne dönüşme hızı azalmış olur.

Metanol zehirlenmelerinde uygulanan tedavi yarışmalı inhibisyonun güzel bir örneğidir. Karaciğer alkol dehidrojenaz enzimi vücuda alınmış olan metanolü formaldehite çevirir ve oluşan formadehit özellikle gözlerde kalıcı körlüğe neden olur. Buna engel olmak için vücuda alkol dehidrojenaz enzimine alternatif bir substrat olan etanol kontrollü olarak verilir ve metanolün hızlı bir şekilde formaldehite çevrilmesi engellenir.

b)Yarı yarışmalı inhibisyonda inhibitör sadece ES kompleksine bağlanır ve reaksiyonu inaktive eder.

c)Yarışmasız inhibisyonda ise inhibitörler enzimin aktif bölgesi dışında bir bölgeye bağlanır ve reaksiyonu durdururlar.

Bazı geri dönüşümlü inhibitörler hedef enzimlerine geri dönüşümsüz inhibitörler gibi oldukça sıkı bağlanırlar. Bu sıkı bağlanan inhibitörler, kovalent geri dönüşümsüz inhibitörlere benzer kinetik özelliklere sahiptirler. Bu durumda, bu inhibitörlerin bazıları enzime düşük afiniteli bir EI kompleksi oluşturacak şekilde bağlanır ve daha sonra bu kompleks yavaş bir değişime uğrayıp sıkı bağlanmalı bir EI* kompleksi oluşturur. Bu kinetik davranışa yavaş bağlanma

denir. Bağlanmayı takiben enzimin bu şekilde yeniden yapılanması çoğu zaman bir konformasyon değişimi içerir ve genellikle enzim inhibitör molekülün etrafına sarılır. Yavaş bağlanan inhibitöre metotraksat, allopurinol, ve asiklovir (acyclovir)'in aktive olmuş formu sayılabilir.

1.2.3.2. Geri Dönüşümsüz İnhibisyon

Geri dönüşümsüz inhibisyon genelde bir enzimi kovalent olarak değişime uğratar (modifiye eder) ve dolayısıyla inhibisyon geriye döndürülemez. Geri dönüşümsüz inhibitörler enzimin aktivitesi için önemli olan bir işlevsel grubu bozan veya kararlı kovalent bağ olmaksızın kompleks meydana getiren veya enzimle birleşen bileşiklerdir. Genellikle aldehit, haloalkan, alken, Michaelis akseptörü, fenil sülfonat, fluorofosfonat grupları gibi reaktif fonksiyonel gruplar taşırlar ve bu elektrofilik gruplar amino asit yan zincirleri ile tepkimeye girerek kovalent bağlı araürün (adduct) oluştururlar. Değişime uğrayan amino asit kalıntıları, yan zincirlerinde hidroksil veya sülfidril grubu gibi nükleofil gruplar içeren serin (DFP ile reaksiyona girer), sistein, treonin ve tirozin gibi amino asitlerdir.

Yarışmalı geri dönüşümsüz inhibisyon substrat ile inhibitörün benzer yapıda olduğu bir türdür. İnhibitör substrat gibi davranarak aktif bölgeye kovalent olarak bağlanır, fakat oluşan kompleks tekrardan ayrılmaz. Böylelikle enzim inaktive olmuş olur. Bu tür inhibisyon daha düşük dozlarda ilaç kullanımını gerektirir. Vigabatrin yarışmalı geri dönüşümsüz inhibisyon için iyi bir örnektir (Gram, 1989). Hayvanlarda özellikle farelerde vigabatrin sırayla 1-3 ve 5 saat metabolik yarı ömre sahiptir fakat hedef enzimi olan GABA-AT'a bağlandıktan sonra yarı ömrü birkaç gündür (Messenheimer ve Lamotrigine, 1994, Browne, 1989). Vigabatrin uygulandıktan sonra GABA-AT enziminin aktive olması için gerekli olan hız genetik sentezinin hızına karşılık gelir. Bazı durumlarda, özellikle hedef enzimin genetik oluşumu çok yavaş olduğunda, vigabatrinin etkileri vücuda verilmesi kesilerek daha etkili bir şekilde kontrol edilebilir ve bu da geri dönüşümsüz inhibitörlerin tasarımı için oldukça önemlidir. Kanser veya mikrobiyal enfeksiyonlar gibi daha yayılmış olan ve daha uzun tedaviler gerektiren hastalıklarda geri dönüşümsüz inhibisyon daha uygun bir tedavidir (Barf ve Kaptein, 2012).

1.2.3.3. Mekanizma Bazlı İnhibisyon

Geri dönüşümsüz inhibitörlerin bir çeşidi de mekanizma bazlı inhibitörlerdir. İntihar inhibitörü veya mekanizma bazlı inhibitörler, enzimin aktif bölgesini modifiye etmek için çok özel şartlar oluşturan değiştirilmiş substratlardır. Bu inhibitörler spesifik enzimin substratları

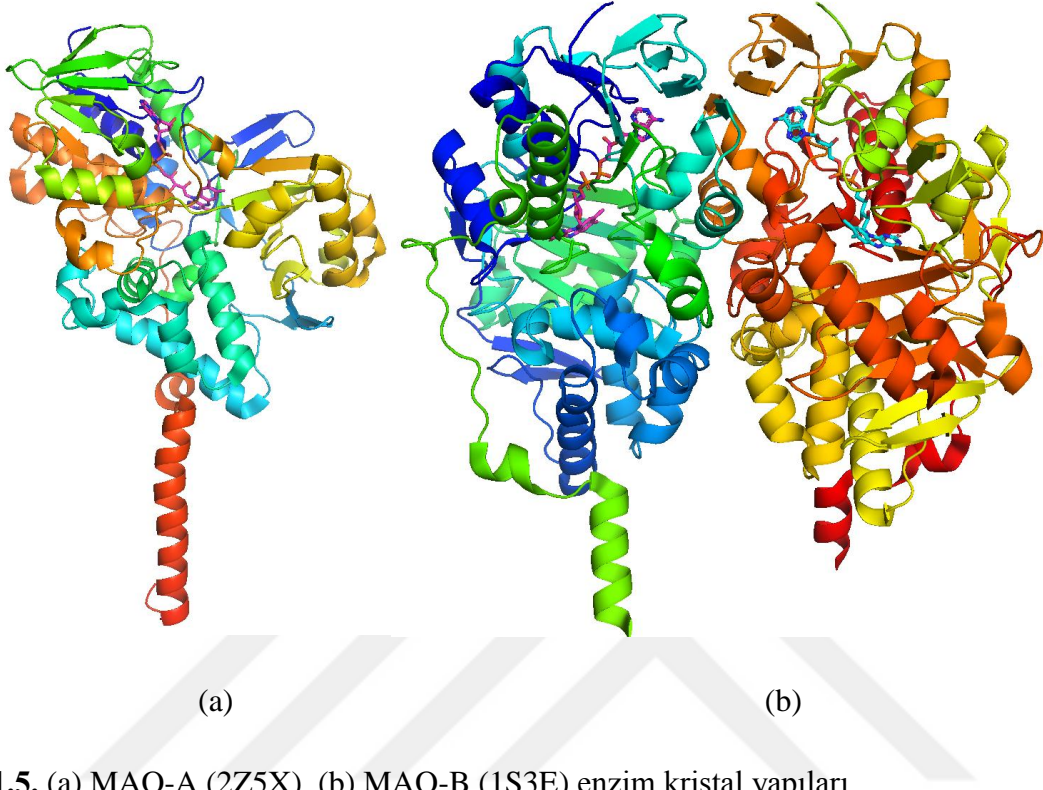
ile benzer yapıdadır ve enzime substrat olarak bağlanır. Başlangıçta normal enzim kataliz mekanizmasının ilk birkaç basamağına uygun olarak etki gösterirler, daha sonra ilerleyen basamaklarda kimyasal olarak reaktif ara ürün oluştururlar ve enzimi kovalent modifikasyon ile inaktive ederler. Bu tip inhibitöre N,N-dimetilproparjilamin örnek gösterilebilir. Monoamin oksidaz dopamin ve serotonin gibi nörotransmitterleri oksitleyerek beyin dokularındaki seviyelerini düşürür. Parkinson hastalığı dopamin seviyesindeki düşüklük ile, depresyon ise serotonin seviyesindeki düşüklük ile alakalıdır. Monoamin oksidaz'ın koenzimi olan flavin halkası N,N-dimetilproparjilamin'i oksitler ve böylece flavinin N5 atomuna bağlanarak flavin grubunu kovalent olarak modifiye eder ve enzimi inhibe eder (Berg vd., 2002). İlk MAO-B inhibitörlerinden selejilin (Riederer ve Przuntek, 1987) ve daha sonra geliştirilen rasajilin (Weinreb vd., 2011) Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılan ve çalışma prensipleri mekanizma bazlı inhibitörlere benzeyen diğer inhibitörlerdir. Selejilin ve rasejilin analogları flavinin N5 pozisyonundaki azot atomuna saldırarak kovalent bağlı geri dönüşümsüz bir araürün oluştururlar. Hubálek ve arkadaşları (2004) tarafından gerçekleştirilen X-Ray yapı aydınlatma çalışmaları sonucu bu araürün yapısı karakterize edilmiştir.

Günümüzde akılcı ilaç tasarımı çalışmaları kovalent bağlı geri dönüşümlü inhibitörler tasarlama üzerine yoğunlaşmıştır. Kovalent bağlı geri dönüşümlü inhibitörler sayesinde enzim tamamiyle bloke olmadan enzim kataliz hızını yavaşlatarak yan etkileri daha az ilaç uygulamalarına zemin hazırlanacağı düşünülmektedir. Bu nedenle geri dönüşümlü kovalent inhibitörler tasarlamak proteinlerin kalıcı modifikasyonlarının yarattığı olumsuz sonuçları bertaraf etmek ve üstün tedavi imkanları yaratabilmek için oldukça önemlidir (Singh vd., 2011). Son yıllarda kovalent bağlı inhibitörlere olan ilgi önemli ölçüde artmıştır. Fakat burada en önemli sorun inhibitörlerin tasarımının yapılması ve etkilerinin araştırılmasındaki uygulamalardır (Singh vd., 2011;Mah vd., 2014).

1.2.4. Monoamin Oksidaz (MAO)

Monoamin oksidaz (EC1.4.3.4, MAO), serotonin, dopamin, norepinefrin, epinefrin gibi nörotransmitter aminlerin oksidasyonunu katalizleyen ve hücre içi konsantrasyonun düzenlenmesinde önemli rol oynayan dış mitokondri membran proteini. 1968 yılında MAO'nun %70 oranında birbirine benzeyen MAO-A ve MAO-B olmak üzere iki farklı formu olduğu bulunmuştur (Şekil 1.5). Bu iki enzim; substrat tercihleri, immünolojik özellikleri, doku dağılımları, inhibitör özgünlüğü ve amino asit dizilimleri bakımından birbirlerinden ayrılmasına karşın oksidasyon mekanizmalarının aynı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca her

iki MAO da dış mitokondriyal membrana C-terminal α -heliks bölgelerinden bağlanırlar ve diğer hidrofobik bölgelerle diğer membran etkileşimlerini oluştururlar (Rebrin vd., 2001; Binda vd., 2002; Ma vd., 2004).



Şekil 1.5. (a) MAO-A (2Z5X) (b) MAO-B (1S3E) enzim kristal yapıları

MAO-A seçici olarak serotonin (5-hidroksitriptamin), epinefrin ve norepinefrin nörotransmitter aminlerini metabolize ederken, MAO-B ise benzilamin, dopamin ve feniletilamin nörotransmitter aminlerini okside etmeyi tercih eder ve norepinefrin ve serotonin de yavaş olmakla birlikte oksitleyebilir (Fowler ve Benedetti, 1983; Gaweska ve Fitzpatrick, 2011). MAO-B ayrıca 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP)'den, Parkinson hastalığı nedeni olan nörotoksin 1-metil-4-fenil-piridinyum'u oluşturur (Chiba vd., 1984)

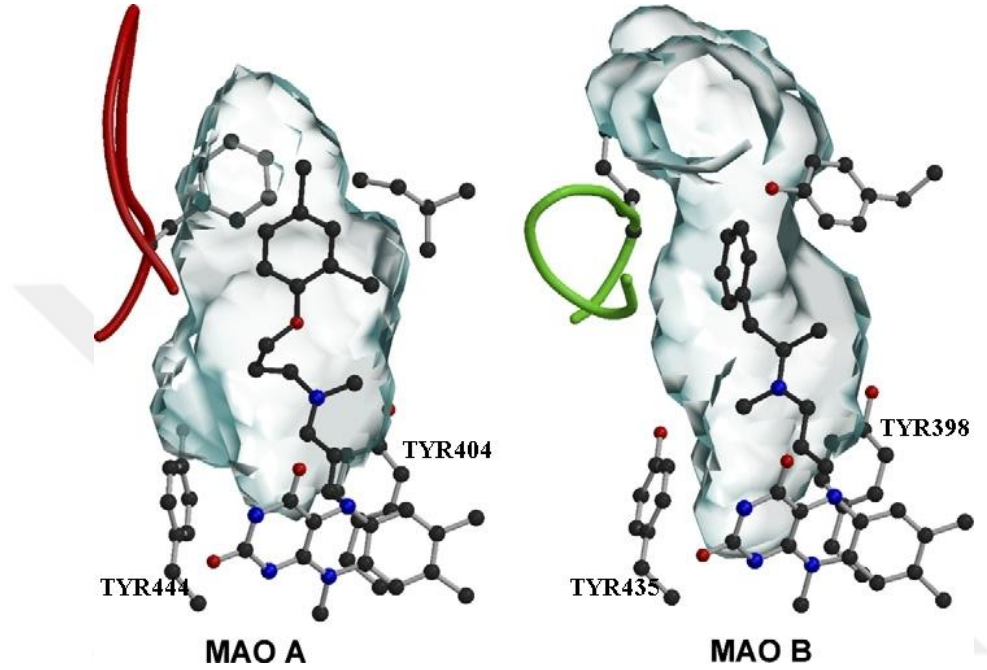
Serotonin (5-HT ya da 5-hidroksitriptamin), insanda mutluluk, canlılık ve zindelik hissi veren bir hormon ve nörotransmitter amindir. Eksikliğinde depresif, yorgun, sıkılgan bir ruh hali görülür. Norepinefrin (noradrenalin) merkezi sinir sistemi ve sempatik sinir sistemi nörotransmitteridir ve beynin dikkat ve çevreye yanıt verme ile ilgili kısımlarını etkiler. Epinefrin (adrenalin), böbrek üstü bezleri ve sempatik sinir sistemindeki sinir uçlarından salgılanan, kalp atışını hızlandıran bir hormondur. Dopamin vücutta doğal olarak üretilir ve

beyinde dopamin reseptörlerini aktive ederek nörotransmitter olarak görev yapar. Sempatik sinir sistemi üzerindeki etkisi nedeniyle ilaç olarak kullanılır.

Monoamin oksidaz inhibitörleri klinik olarak depresyon, Parkinson, Alzheimer gibi hastalıkların ve diğer nörodejeneratif hastalıkların tedavilerinde kullanılırlar (Youdim vd., 2006). Depresyon durumunda, noradrenalin ve serotonin miktarı önemli ölçüde azaldığından MAO-A'yı inhibe edici bileşikler anti-depresyon ilaçları olarak tasarlanır. Parkinson hastalığında ise beyindeki dopamin miktarı önemli ölçüde azaldığından MAO-B'nin inhibisyonu dopamin deaminasyonunun azalmasını ve dopamin seviyesinin normal düzeye çıkmasını sağlar.

Her iki MAO enzimi yapısal olarak farklılıklar içermektedir. Upadhyay ve arkadaşları (2008) tarafından gerçekleştirilen NMR çalışmaları insan ve fare MAO enzimlerinin dimer olarak kristallendiğini, sadece insan MAO-A'sının monomer olarak kristallendiğini belirlemiştir (Şekil 1.5). MAO-B enziminde substrat enzimin aktif merkezine ulaşmak için enzimin iç kısmında bulunan iki oyuktan geçmelidir. Bu oyuklardan ilki 290 Å'luk hacime sahip giriş oyuğudur. Giriş oyuğundan geçen substrat "Substrat oyuğu" adı verilen 390 Å'luk daha geniş bir bölgeye ulaşır (Şekil 1.6). Bu iki oyuk arasında bulunan İzölösün-199 amino asidi (Ile199) bu iki oyuk arasında kapı görevi görür ve substrat veya inhibitöre göre bu kapı açılır ve kapanır. Ile199 amino asidinin varlığı MAO-B enziminde inhibitör spesifikliğı için önemli rol oynamaktadır (Hubálek vd., 2005). Substrat oyuğunun sonunda 8a pozisyonundan Sistein-397 kalıntısına (Cys-397) tiyoeter bağı ile kovalent olarak bağlanmış FAD koenzimi bulunur (Edmondson vd., 2007). "GRID" programı kullanılarak yapılan aktif bölge boşluklarının analizinde her iki boşluğunda oldukça hidrofobik olduğu ve amin bağlanma bölgesinde birbirine yakın paralel iki tirozin (Tyr398 ve Tyr435) amino asidi bulunduğu gözlemlenmiştir. Aromatik kafes olarak tanımlanan bu bölge katalitik mekanizması için büyük bir öneme sahiptir (Edmondson vd., 2007). MAO-A enziminde ise aktif bölge 550 Å'luk bir hacime sahip tek bir oyuktan oluşmaktadır ve yapılan aktif bölge analizlerine göre substratın MAO-A'nın aktif bölgesinde MAO-B'nin aktif bölgesine kıyasla daha rahat dönebildiğı görülmüştür (Edmondson vd., 2007). MAO-B'de olduğu gibi MAO-A enzimlerinde de kovalent bağı FAD'nin re-yüzünde birbirine yakın mesafede paralel iki tirozin (Tyr404 ve Tyr444) amino asit kalıntısı bulunur ve aynı şekilde aromatik kafes olarak adlandırılan bu bölge oldukça hidrofobik özelliktedir. Edmondson ve grubu (Li vd., 2006) tarafından gerçekleştirilen MAO-A'da Tyr444 ve MAO-B'de Tyr435 mutantları ile yapılmış kinetik çalışmalar, mutant enzimlerin aktivitelerinin doğal enzimlerin aktivitesinden daha

düşük olduğunu göstermiş ve aromatik kafesin amin substratının oksitlenmesini kolaylaştırıcı bir etkisinin olabileceğini düşündürmüştür. Aynı şekilde poliamin oksidaz ve trimetilamin dehidrojenaz enzimlerinde gerçekleştirilen yapı analizleri MAO'ya benzer şekilde flavinin ön yüzünde aromatik özellik taşıyan amino asit kalıntılarının aromatik kafes oluşturduğunu göstermiştir (Edmondson vd., 2009). Grubumuz tarafından gerçekleştirilen teorik çalışmalar da bu bulguları destekleyecek niteliktedir (Akyüz vd., 2007) (Şekil 1.6).



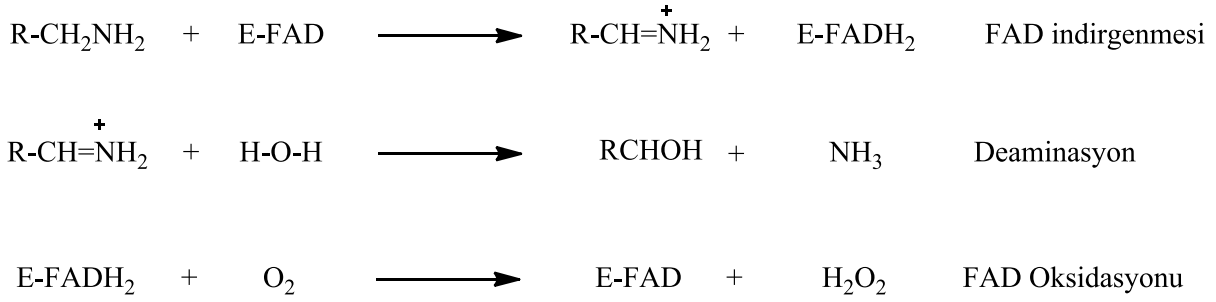
Şekil 1.6. MAO-A ve MAO-B enzimlerinin aktif bölge boşlukları ve aromatik kafes (Edmondson vd., 2007)

Flavin koenzimleri enzimlerin Histidin (Chlumsky vd., 1998) ya da Sistein (Kearney vd., 1978) kalıntlarına C-6 veya C-8a pozisyonlarından kovalent bağlı olarak bulunabileceği gibi kovalent bağısız (Doukyu, 2009) olarak da bulunabilirler. Flavin koenzimi barındıran enzimlerin sadece %10'unda flavin halkası enzime kovalent olarak bağlı bulunur (Starbird vd., 2015). MAO enzimleri ve piranoz 2-oksidad (P2O) enzimleri FAD halkasını enzime kovalent bağlı olarak bulundururlar (Sucharitakul vd., 2010). Alkol oksidaz (AO) enziminde ise enzim ile flavin halkası birbirine bağlı değildir (Ozimek vd., 2005). MAO-A ve B enzimlerinde Flavin C8a pozisyonundan enzime sırasıyla Cys403 ve Cys397 amino asit kalıntıları aracılığıyla bağlı bulunmaktadır. Piranoz 2-oksidad enziminde ise C8a pozisyonundan His167 amino asidine bağlıdır (Sucharitakul vd., 2010). Fakat tüm bu çalışmalara rağmen MAO enziminin kovalent bağlı olmasının enzim aktivitesi üzerine etkisi açıklık kazanamamıştır.

1.2.4.1. MAO Amin Oksitleme Mekanizmaları

Günümüzde nörodejenaratif hastalıkların tedavisinde kullanılan mevcut ilaçların yan etkilerinin azaltılabilmesi için seçici ve etkin MAO inhibitörlerine ihtiyaç vardır. Bu sebeple enzimin substratı olan aminleri nasıl bir tepkime mekanizması üzerinden oksitlediği yoğun ilgi odağıdır ve bugüne kadar tek elektron transferi, proton transferi ve hidrür transferi içeren çeşitli mekanizmalar önerilmiştir. Son yıllarda en fazla üzerinde tartışılan polar nükleofilik (proton transferi) ve hidrür transfer mekanizmalarıdır. MAO mekanizması için yapılan çalışmalar önemli oranda deneysel verilere dayanmaktadır. Hesaplamalı çalışmalar ise tarafımızdan başlatılmış olup küçük/orta büyüklükte model yapılara uygulanabilmiştir (Erdem ve ark. 2006). Son birkaç yıl içinde ise enzimin tamamına uygulanan QM/MM hesaplamaları yapan çalışmalar ardarda yayınlanmıştır. X-ışını yapılarının aydınlatılması aktif bölge amino asitlerinin koordinatlarını, birbirleri ve inhibitör ile olan etkileşimlerini, inhibitörün bulunduğu bölgenin yapısına göre yeni inhibitörler tasarlamayı sağladığı için hesapsal çalışmalara oldukça önemli bir kapı açmıştır. Özellikle son yıllarda yüksek çözünürlüklü MAO-A ve MAO-B'nin x-ışını yapılarının aydınlatılması hesaplamalı çalışmalardan daha başarılı ve gerçekçi sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır. Farmakolojik öneme sahip olan bu enzimlerin oksitleme ve inaktivasyon mekanizmalarının incelenmesinde, küçük model moleküller yerine enzimin aktif bölgesinin tamamının dahil edilmesi aktif bölge amino asitlerinin substrat üzerindeki etkilerinin hem toplam olarak incelenmesini hem de özellikle üzerinde durulan amino asitlerin etkilerinin tek tek incelenebilmesine olanak sağlamaktadır. Ancak yapılan deneysel ve hesaplamalı çalışmalar bugüne kadar hangi mekanizmanın gerçek mekanizma olduğu cevabını verememişlerdir.

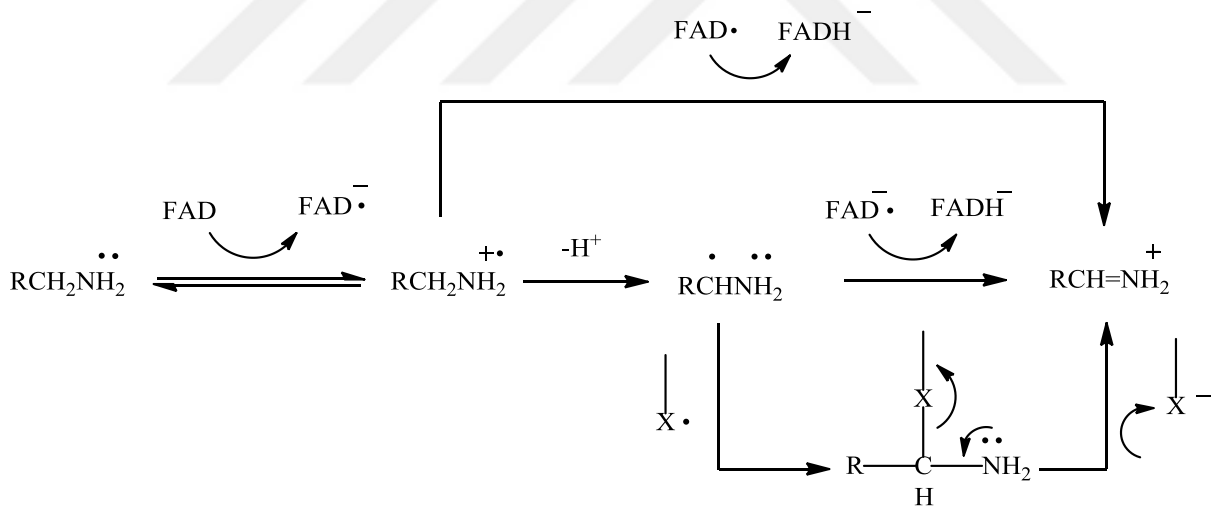
MAO katalizörlüğünde aminlerin oksidatif deaminasyonu enzimin aktif bölgesinde yer alan FAD kofaktörü üzerinden gerçekleşir (Şekil 1.2) ve genel olarak şu basamaklardan oluşur: Nörotransmitter aminler önce FAD ile yükseltgenerek iminlere dönüştürülür. Oluşan bu iminler daha sonra enzimatik olmayan bir şekilde hidroliz olup aldehit ve amonyaka parçalanırlar. İndirgenmiş FAD ise moleküler oksijenle yükseltgenerek yeniden reaksiyon için hazır hale gelir (Şekil 1.7).



Şekil 1.7. MAO'nun nörotransmitterleri oksitleme mekanizması

1.2.4.1.1. Tek Elektron Transferi Mekanizması

Silverman tarafından önerilen (1993) tek elektron transferi (SET) mekanizması amin oksidasyonlarında ve MAO-B'de mekanizma-bazlı çeşitli inhibitörlerin birçok halka açılması tepkimeleri için önerilen (SET) kimyasına dayanmaktadır. Bu mekanizmaya göre oksidasyon reaksiyonu substratın amin-N (N11) üzerinde bulunan elektron çiftinden tek elektronun flavin üzerine aktarılması ile başlar ve daha sonra amin αH'ni proton olarak flavine aktarılır. Oluşan karbon radikalinden bir elektronun daha göç etmesiyle reaksiyon tamamlanır (Silverman, 1992; Silverman, 1995) (Şekil 1.8).



Şekil 1.8. Tek elektron transferi (SET) mekanizması

Bu mekanizma üzerinde deneysel ve teorik olarak gerçekleştirilen çalışmalar mekanizmanın olasılığını çürütmüşlerdir. Bu mekanizmaya karşı sunulan görüşlerin en bilineni; MAO-A ve MAO-B için katalitik öneme sahip radikal ara ürünün saptanmasındaki başarısızlıktır (Edmondson vd., 2007). Ayrıca tek elektron transferi için termodinamik bariyer oldukça yüksektir ve aminlerin yüksek redoks potansiyeli ($E_m = + 1.5 \text{ V}$) flavin kofaktörü tarafından

okside edilmelerini çok mümkün kılmamaktadır (Sablin ve Ramsay, 2001). Grubumuz tarafından (Erdem ve Büyükmenekşe, 2011) ve son dönemde diğer gruplar tarafından gerçekleştirilen çalışmaların (Vianello vd., 2012; Abad vd., 2013) hesaplamalı sonuçları da SET mekanizmasına karşı kanıtlar sunmuştur.

Bu sebeple yakın zamandaki çalışmaların odağında geriye kalan diğer iki mekanizma yer almaktadır.

1.2.4.1.2. Tek Basamaklı Hidrür Transferi Mekanizması

Fitzpatrick (2004) tarafından önerilen tek basamaklı hidrür mekanizmasına göre substratın α -H'i hidrür (H⁻) olarak flavine aktararak amin (substrat) iminyum katyonuna (RCH=NH₂⁺) yükseltgenir. İki elektron ve bir protonun flavine aktarılması ile reaksiyon tamamlanmış olur (Şekil 1.1.a).

Tek basamakta gerçekleşen bu reaksiyon için gerekli olan aktivasyon enerjisi yüksek olduğundan pek mümkün görülmemektedir. Fakat diğer yandan, son yıllarda bilim insanları MAO'ya benzer olan D-aminoasit oksidaz (DAAO) enziminin oksidasyon mekanizmasının tek basamakta gerçekleşen hidrür transferi olduğu konusunda fikir birliğine ulaşmışlardır (Hopkins vd., 2013). Bu bulgu N-metiltryptofan oksidaz (MTO) (Karasulu ve Thiel, 2015) ve lizin-spesifik demetilaz 1 (LSD1) (Karasulu vd., 2013) enzimleri için uygun olduğu düşünülen mekanizmanın MAO için de mümkün olabileceği ihtimalini tekrar gündeme taşımıştır. Ayrıca Edmondson (2007) tarafından önerilen polar nükleofilik mekanizma için herhangi bir araürün yapısının elde edilememesi de tek basamaklı hidrür transferi mekanizmasının lehine katkı sağlamıştır. Ayrıca grubumuz tarafından gerçekleştirilen teorik çalışmalar da mekanizmanın mümkün olduğunu göstermiştir (Akyüz ve Erdem, 2013; Can, 2007).

1.2.4.1.3. İki Basamaklı Hidrür Transferi Mekanizması

MAO'nun yüksek çözünürlüklü x-ışını yapılarının aydınlatılmasıyla aktif bölge içinde flavinin re-yüzünde 4 tane H₂O molekülü tespit edilmiştir. Bu H₂O moleküllerinin oksidasyon mekanizmasında kritik bir role sahip olabileceği fikrinden hareketle Vianello vd. (2012) tarafından mekanizmaya H₂O molekülleri dahil edilmiştir. Küçük model bir yapı kullanarak iki adımda gerçekleşen hidrür transferi mekanizması önerilmiştir (Şekil 1.1.b). Mekanizmanın birinci adımı bizim de modellemiş olduğumuz tek basamaklı hidrür transferi mekanizması ile benzerdir ancak ürün olarak amin katyonu yerine amin- α C atomu ile flavin-N5 atomunun kovalent bağlanarak bir araürün oluşturduğunu iddia etmişlerdir. İkinci adımda ise kısmen

indirgenmiş flavin H₂O molekülünden bir proton (H⁺) alır ve protonunu kaybeden hidroksil (OH⁻) iminyum katyonundan (NH₂=CHR⁺) proton (H⁺) alarak nötr imin (NH=CHR) bileşiği ve H₂O oluşur. X-ışını yapısında tespit edilen 2 adet H₂O molekülü Vianello vd. (2012) tarafından nötrleştirici ajan olarak kullanılarak mekanizma modellenmiştir. Fakat N5 atomuna bağlı araürün yapısının herhangi bir iminyum katyonuna dönüşmeden amin-N11 azotundan su yardımıyla proton koparabilmesi olası görünmemektedir.

1.2.4.1.4. Polar Nükleofilik Mekanizma

Edmondson vd. (2004) tarafından önerilen polar nükleofilik mekanizma ise çeşitli deneysel bulgulara dayanmaktadır (Şekil 1.1.c). Mekanizmanın birinci basamağında substratın amin azotu (N11) nükleofil olarak flavinin C4a atomuna saldırıp kovalent bağlı bir ara ürün oluştururken flavinin N5 atomu substratın αH'ini alır. İkinci basamakta ise oluşan ara ürün ayrışarak indirgenmiş flavin ve iminyum katyonuna dönüşür. (nükleofilik katılma ve proton transferi aynı basamakta gerçekleşir). Literatürdeki ilk hesaplamalı yayın olan çalışmamızda (Erdem vd., 2006) küçük model yapılara yarı-deneysel kuantum mekanik yöntemle uygulanan kantitatif-yapı-aktiflik ilişkileri Şekil 3c'deki polar nükleofilik mekanizmayı destekleyici önemli kanıtlar sunmuştur. Bu mekanizmadaki araürünün Hartree-Fock ve YFT yöntemleri ile optimize edilememesi nedeniyle mekanizmanın tek-basamakta fakat eşzamansız olarak gerçekleşebileceği ancak diğer alternatiflerin de mümkün olabileceği yorumu yapılmıştır.

1.2.4.1.5. Eşzamansız Tek Basamaklı Polar Nükleofilik Mekanizma

Kastner ve grubu (Abad vd., 2013) tarafından önerilen mekanizmaya göre substratın N11 atomu flavin üzerindeki C4a atomu ile kovalent bağlı araürün oluşturmadan etkileşerek N11 atomu 2e⁻'unu C4a'ya yük transferi ile aktarır. Bu etkileşim N5 atomunun bazlılığını artırarak αH'ni proton olarak kopartabilmesini kolaylaştırır. Böylelikle flavin indirgenirken iminyum katyonu oluşur (Şekil 1.1.d).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Kullanılan Yöntemler

Tez çalışmasında kullanılan yöntemler;

1. Semi-empirik (Yarı Deneysel) PM6 (Stewart, 2008; Stewart, 2009).
2. YFT (Yoğunluk Fonksiyoneli Teorisi) M06-2X/6-31+G(d,p) (Truhlar ve Zhao, 2006).
3. Hibrit yöntemler (ONIOM) ONIOM(M06-2X/6-31+G(d,p):PM6) (Daprach vd., 1999; Karadakov ve Morokuma, 2000)'dır.

Reaksiyon koordinatlarındaki tüm yapılar frekans hesapları ile karakterize edilmiştir. Geçiş konumları (TS) üzerine yapılan İçsel Reaksiyon Koordinatı (IRC) (Fukui, 1981) hesabı ile yapılar teyit edilmiş ve giren kompleksleri (RC) ile ürün kompleksleri (PC) optimize edilmiştir.

2.1.1. Kompleks Sistemler için QM/MM Yöntemleri

QM yöntemler kullanılarak büyük ve kompleks sistemlerin yapı ve özelliklerinin doğru bir şekilde hesaplanması zor ve oldukça fazla zaman alan bir işlemdir. Bu hesaplamaları mümkün hale getirebilmek için teorik kimyacı bilim insanları yoğun çabalar sarfederek çok ölçekli QM/MM hibrit metotları geliştirmişlerdir. Bu nedenle, 2013 Nobel Kimya Ödülü M. Karplus, M. Levitt ve A. Warshel'e verilmiştir. Hibrit metoda göre büyük moleküller birkaç bölüme ayrılarak hesaplamalar gerçekleştirilir ve yüksek seviye yöntemler ile düşük seviye yöntemler farklı kısımlara uygulanırlar. Karplus ve Honig tarafından 1971 de geliştirilen bu metoda göre kuantum mekanik (QM) yöntemler ve klasik moleküler mekanik (MM) yöntemler birleştirilmiştir. Denklem 2.1'de QM/MM yöntemine göre tüm sistemin toplam enerjisi gösterilmiştir. QM metodu ile sistemin enerjisi (E_{QM}), MM metodu ile çevre sistemin enerjisi (E_{MM}) ve QM model sistem ile MM çevre sistemi arasındaki etkileşimden kaynaklanan enerji (E_{QM-MM}) toplanarak sistemin sahip olduğu toplam enerji ($E_{QM/MM}$) hesaplanmıştır.

$$E_{QM/MM} = E_{QM} + E_{MM} + E_{QM-MM} \quad (2.1)$$

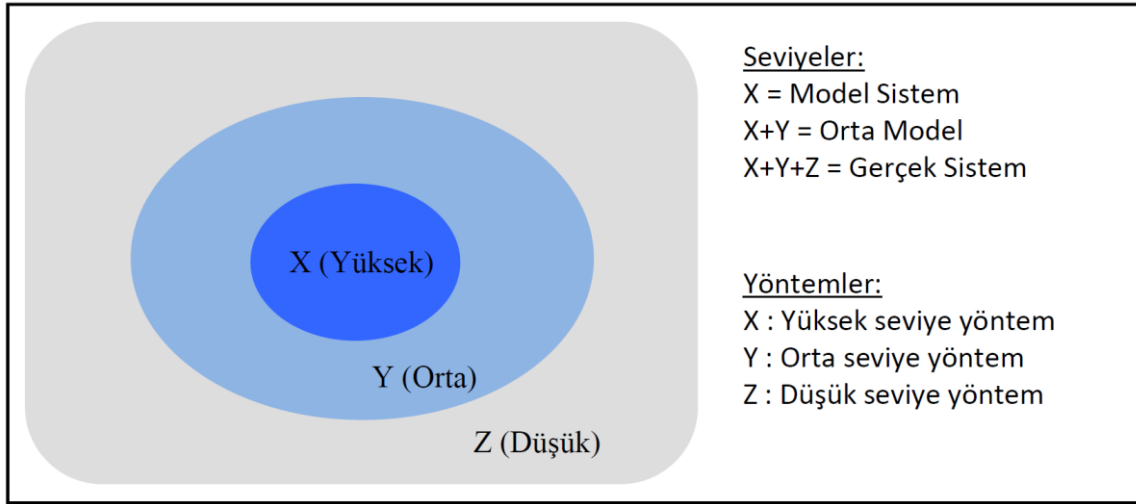
Denklem 2.1'de gösterilen enerji ifadesi bir dizi toplama işlemine dayandığı için toplamalı yaklaşım olarak adlandırılır. İki sistemin enerjisi ve iki sistem arasındaki etkileşim toplanarak tüm sistemin toplam enerjisi hesaplanmıştır (Chung vd., 2015).

Morokuma ve grubu tarafından geliştirilen ONIOM metodu ise toplamalı QM/MM metodunun aksine çıkarmalı bir ekstrapolasyon metottur. Gerçek sistemin toplam enerjisi,

QM metodu ile model sistemin enerjisi (E_{QM}), MM metodu ile tüm sistemin enerjisinin toplamından, MM metodu ile model sistemin enerjisinin farkına eşittir. Yani çıkarmalı işlem hesaplamalara iki kez katılan MM etkileşiminin çıkarılmasıdır.

$$E_{QM/MM} = E_{QM(model)} + E_{MM(gerçek\ sistem)} - E_{MM(model)} \quad (2.2)$$

ONIOM genel iki katmanlı QM/MM metodunun farklı bir çeşidi olarak düşünülebilir. Buna rağmen ONIOM metodunda iki katmanlı QM/MM metodu kullanılabileceği gibi ayrıca farklı QM/QM metotları birlikte kullanılarak birkaç katmana kolaylıkla ayrılabilir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. ONIOM seviyelerinin tanımlanması

2.1.2. Solvent Etkisinin Katılması

Reaksiyonlarda solvent etkisi kimyasal ve fiziksel özellikler açısından oldukça önemlidir. Teorik olarak gerçekleştirilen hesaplamalara solvent etkisini katmak için iki çeşit yaklaşım bulunmaktadır. Bunlardan ilki solvent moleküllerinin yapıya dahil edildiği gerçek (explicit) solvent modelidir. Diğeri ise sürekli ortam olarak tanımlanan temsili solvent modelidir. Bu iki metot özellikle ONIOM hesaplamalarına solvent etkisini katmak amacıyla geliştirilmiştir (Chung vd., 2015).

2.1.2.1. Gerçek (Explicit) Solvent Model

Gerçek solvent model sistemlerinde solvent molekülleri sisteme yerleştirilerek hesaplamalar gerçekleştirilir. Daha önceleri geliştirilen benzer metotlar (MD yada Monte Carlo(MC)) farklı solvent konfigürasyonları sağlamak için kullanılmıştır. Fakat çoklu seviye metotlarını birleştirmek için klasik metotlar birçok problemle karşılaşmıştır. Bu problemlerden en önemlisi yüksek seviyedeki solvent moleküllerinin simülasyon sırasında aktif bölgeye girip çıkmasından kaynaklanan kesintili potansiyel enerji ve kuvvetlere neden olmasıdır. Morokuma ve grubu tarafından bu problemi çözmek için ONIOM-MD metot geliştirilerek

ONIOM-XS metodu kullanılmaya başlanmıştır (Kerdcharoen ve Morokuma 2003). Bu metoda göre solvent moleküllerinin geçişini yumuşatmak için düşük ve yüksek seviyeler arasına ince bir kabuk tabaka konumlandırılmış ve sistemin enerjisi bu kabuk tabakanın nasıl tanımlandığına bağımlı olarak değişmektedir.

Kimyasal reaksiyonların teorik olarak hesaplandığı ilk günlerde solventin sadece hesaplama sürelerini etkilediği düşünülmüştür. Fakat gerçek sistemde çözünen madde solvent molekülleri ile çevrilidir ve bu moleküller bazı reaksiyonlarda elektrostatik etkileşim ve hidrojen bağları ile ağ motifleri oluşturarak yapıyı kararlılaştırmaktadır. Re ve arkadaşları (Re ve Morokuma, 2004) bir veya iki su molekülü ile metil klorürün SN2 reaksiyonunda solvasyonun etkisini incelemiştir. ONIOM(QM/QM) metodu ile gerçekleştirilen çalışmada susuz, 1 su ve 2 su molekülü içeren yapılarda iki suyun var olduğu yapının aktivasyon bariyerinin daha düşük olduğu belirlenmiştir.

Gerçek solvent etkisi sadece kimyasal reaksiyonlar için değil aynı zamanda biyomoleküller için de çok önemlidir. Özellikle Cu^{2+} , Mg^{2+} , Li^+ , Na^+ , ve K^+ gibi katyonları çevreleyen su molekülleri enerji ve yapı açısından DNA ya bağlanmalarını etkilemektedir. Bağlanma enerjisi fosfat gruplarının ve katyonların çevrelerindeki hidrojen bağ motiflerine bağlıdır. Suresh ve arkadaşları (2002) tarafından 3 katmanlı ONIOM(B3LYP/6-31G(d):PM3:UFF) metodu kullanılarak DNA parçası ve hidrat Mg^{2+} ve Ca^{2+} katyonları kullanılarak birçok model sistem incelenmiştir. DNA parçasının anyon ve dianyon modelleri kıyaslanmış ve buna göre anyon model için tek dişli ligand bağlanma yapısının hem Mg^{2+} hem de Ca^{2+} sistemleri için daha kararlı olduğu görülmüştür. Buna karşın dianyon model için katyonlar ve DNA parçası arasındaki etkileşim geniş yapısal bozulmalara ve halka yapılarının bozulmasına neden olmuştur.

2.1.2.2. Temsili (Implicit) Solvent Model

Solvent etkisi solvent molekülleri kullanılmadan temsili olarak hesaplamalara dahil edilebilir. Temsili solvent etkisi ile solventin dielektrik sabiti (ϵ) esas alınarak sistemin yük, geometri ve reaksiyon enerjisi üzerinde yarattığı değişiklikler hesaplamalara dahil edilmiş olur. Günümüzde SCRF yönteminin bir alt modeli olan PCM metodu (polarizable continuum model) teorik kimyada oldukça yaygın kullanılan klasik bir yöntemdir. Temsili solvent modelin derişik çözücülerin elektrostatik etkilerinin hesaplamalara dahil edilmesi, kolay yakınsama ve solvent moleküllerinin sayısından bağımsız olması gibi bir çok avantajı vardır. Wu ve arkadaşları (2011) tarafından gerçekleştirilen çalışma; gerçek sistemde DNA

oligomerlerinin geometrisi ile ONIOM-PCM metodu ile gerçekleştirilen optimizasyonlar sonucu elde edilen geometrilerin benzer olduğunu göstermiştir. Ayrıca uyarılmış haldeki absorpsiyon emisyon spektroskopisi gibi özellikler çevreye karşı oldukça hassas olduğundan solvent etkisinin hesaplamalara eklenmesi oldukça önemlidir. ONIOM-PCM metodunun dezavantajı ise solvent moleküllerinin yarattığı kararlılığı karşılayamamasıdır (Chung vd., 2015).

2.1.2.3. Gerçek (Explicit) ve Temsili (Implicit) Solvent Etkisinin Hesaplamalara Birlikte Eklenmesi

Temsili solvente ek olarak gerçek solvent moleküllerinin de aynı reaksiyonlarda görev aldığı sistemler bulunmaktadır. Bu sistemlerde hem gerçek hem de temsili solvent birlikte hesaplamalara katılır ve geometri, kimyasal reaksiyon ve kimyasal özellikleri etkiler (Chung vd., 2015). Özellikle katalitik ve enzimatik reaksiyonlar, DNA ve RNA ailesinin geometrileri için literatürde birçok çalışma bu şekilde gerçekleştirilmiştir. Marianski ve arkadaşları (2012) polialanin yapısının α -heliksi için temsili ve gerçek solventin etkisini tartışmışlardır. Gerçek su moleküllerinin heliksin C ve N terminalleri ile kurdukları H-bağları sayesinde daha kararlı konformasyona sahip oldukları ve böylelikle kendi dipol momentinin toplamına daha yakın dipol momentinin elde edilmesine yardımcı olduğunu belirlediler. Ayrıca gerçek sisteme oldukça yaklaşmış olan sanal sistemlerin elde edilebiliyor olması gelecek teorik çalışmalar için ümit vericidir.

2.1.3. Kümeleme (Cluster) Yaklaşımı

Enzim, DNA ve RNA gibi yüksek molekül ağırlıklarına sahip büyük ve kompleks sistemlerin yüksek seviye metotlar kullanılarak modellenmesi günümüz şartlarında mümkün değildir. Bu amaçla geliştirilen yöntemlerden biri olan kümeleme (cluster) yaklaşımı son yıllarda özellikle enzimatik reaksiyonların hesaplamalı olarak modellenmesinde kullanılmaktadır. Enzimin aktif bölgesi kullanılarak elde edilen daha küçük model yapılar ile enzimin tamamını temsil eden minimum büyüklükteki model yapı belirlenir ve hesaplamalar belirlenen bu model yapı ile gerçekleştirilir.

Kullanılan kümeleme yaklaşımı ile özellikle enzimatik reaksiyonlarda aktif bölge giderek büyütülerek reaksiyon enerji değerlerinin yakınsaması ile minimum büyüklükteki model yapı ve bu yapının çevresine enzimin geri kalanını temsil eden dielektrik sabiti (ϵ) ilave edilerek hesaplamalar gerçeğe uygun olarak bulunur (Georgieva ve Himo, 2010; Siegbahn ve Himo, 2011).

2.1.4. Yük Hesaplamaları (NBO)

NBO (Natural Bond Orbital) analizi molekül-içi ve moleküller-arası bağ yapıcı etkileşimleri, yük transferlerini ve delokalizasyonu gözlemleyebilmek için uygun bir yaklaşımdır. NBO hesaplamaları kapsamında ikinci dereceden pertürbasyon teorisi analizi sonucunda elde edilen $E(2)$ enerji değerleri donör (i)-akseptör (j) etkileşimlerinin ortaya çıkardığı kararlılığı temsil eder ve aşağıdaki formül ile hesaplanır:

$$E(2) = \Delta E_{ij} = q_i \frac{F(i,j)^2}{E_j - E_i} \quad (2.3)$$

Denklem 2.3'te, $E(2)$ kararlılık enerjisi, q_i donör orbitaldeki elektron sayısı, E_i , E_j NBO Fock matrisinin diyagonal elemanları ve $F(i,j)$ diyagonal olmayan elemanları temsil eder. $E(2)$ değeri ne kadar büyük ise etkileşim o kadar şiddetlidir. Elektron yoğunluğunun Lewis tipi dolu NBO orbitallerinden (bonding:BD ve/veya lone pair:LP) boş NBO orbitallerine (antibonding:BD*, LP* veya Rydberg:RY*) delokalize olması kararlılık kazandıran donör-akseptör etkileşimleri ile ilişkilidir (Foster ve Weinhold, 1980; Reed vd., 1988).

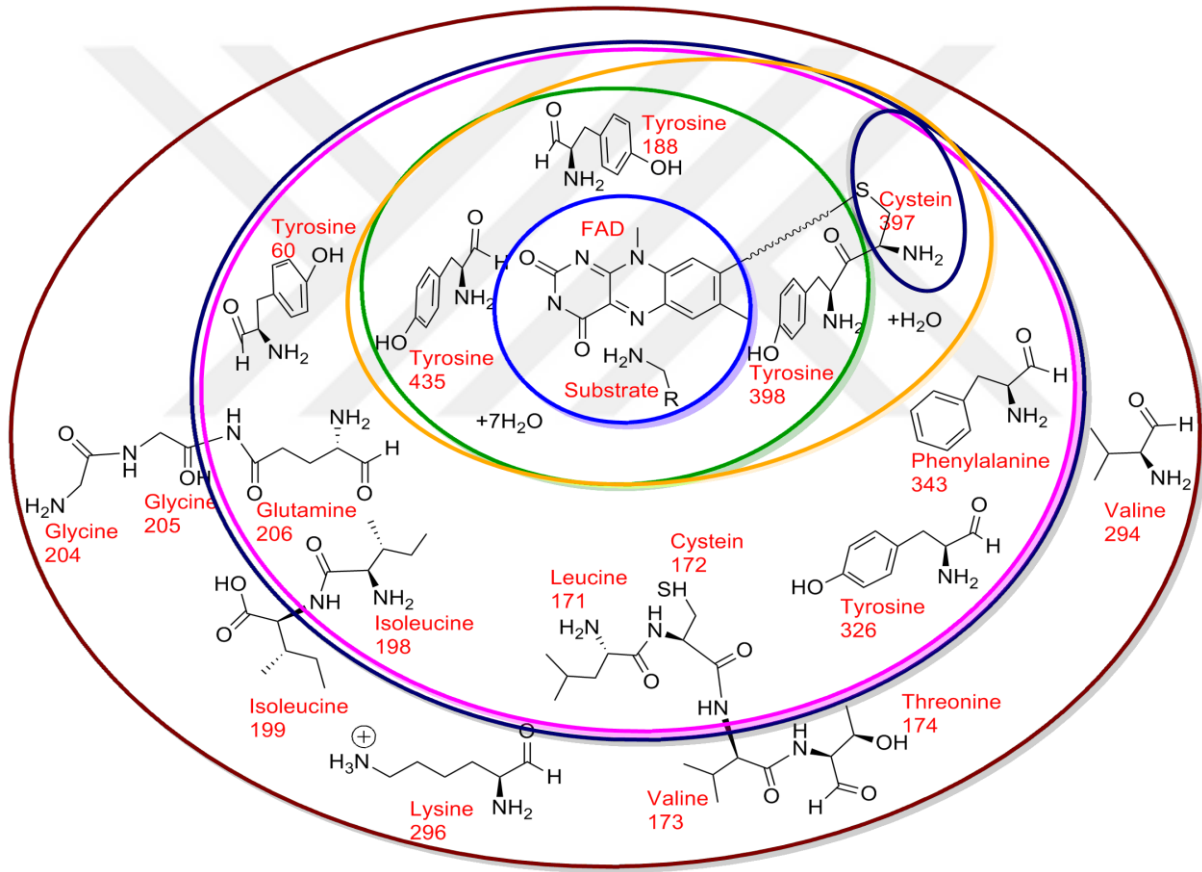
2.2. Kullanılan Materyaller

2.2.1. Aktif Bölgenin Seçilmesi Ve Kullanılan Model Yapılar

Enzim koordinatları MAO-A enzimi için 2Z5X (Binda vd., 2004) pdb kodlu, 2.2 Å çözünürlüğe sahip, MAO-B enzimi için 2XFN (Bonivento vd., 2010) pdb kodlu ve 1S3E (Son vd., 2008) pdb kodlu, 1.6 Å çözünürlüğe sahip x-ışını kristalografik verileri kullanılarak belirlenmiştir. Enzimin reaksiyon mekanizmasını modelleyebilecek en uygun optimum yapıya ulaşabilmek için kümeleme (cluster) yaklaşımı (Liao vd., 2011) kullanılmıştır (Engin, 2015). Optimum aktif bölge yapısının belirlenmesi için geliştirilen bu yaklaşımda belirlenen model yapı (MODEL I) katmanlar halinde büyütülerek farklı büyüklüklerde model yapılar oluşturulmuştur (Şekil 2.2).

Kümeleme yaklaşımına göre belirlenen 6 model yapı aşağıdaki birimlerden oluşturulmuştur (Şekil 2.2).

- ~ MODEL I = Flavin + Substrat (48 atom) [Substrat: Benzilamin]
- ~ MODEL II = MODEL I + Tyr398 + Tyr435 + Tyr188 + 7H₂O (141 atom)
- ~ MODEL III = MODEL II + Phe343 + Tyr326+ Cys172+ Leu171 + Ile198 + Glu206 + Tyr60 + H₂O (281 atom)
- ~ MODEL IV= MODEL III + Cys397 (290 atom)
- ~ MODEL V= MODEL IV + Gly204 + Gly205 + Ile199 + Lys296 + Val173 + Val294 + Thr174 (388 atom)



Şekil 2.2. Kuantum kümeleme yaklaşımına göre enzimin aktif bölge modelleri (MODEL I : mavi, MODEL II : yeşil, MODEL IIa : sarı, MODEL III : pembe, MODEL IV : koyu mavi, MODEL V : kahverengi).

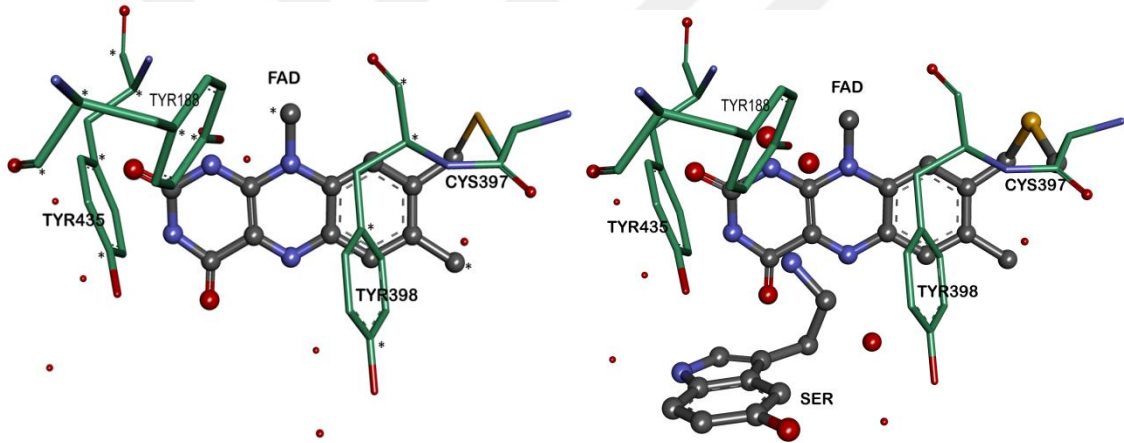
MODEL V oluşturulurken Lys296 protonlanmış + yüklü olarak modele dahil edilmiştir. Yukarıdaki modellere ek olarak, Cys397 ile kovalent bağlı flavinin katalizlemeye etkisini araştırmak üzere aşağıdaki MODEL IIa yapısı devreye sokulmuştur:

MODEL IIa = MODEL II + Cys397 + 1H₂O (152 atom) [Substrat: Serotonin] (Şekil 2.3)

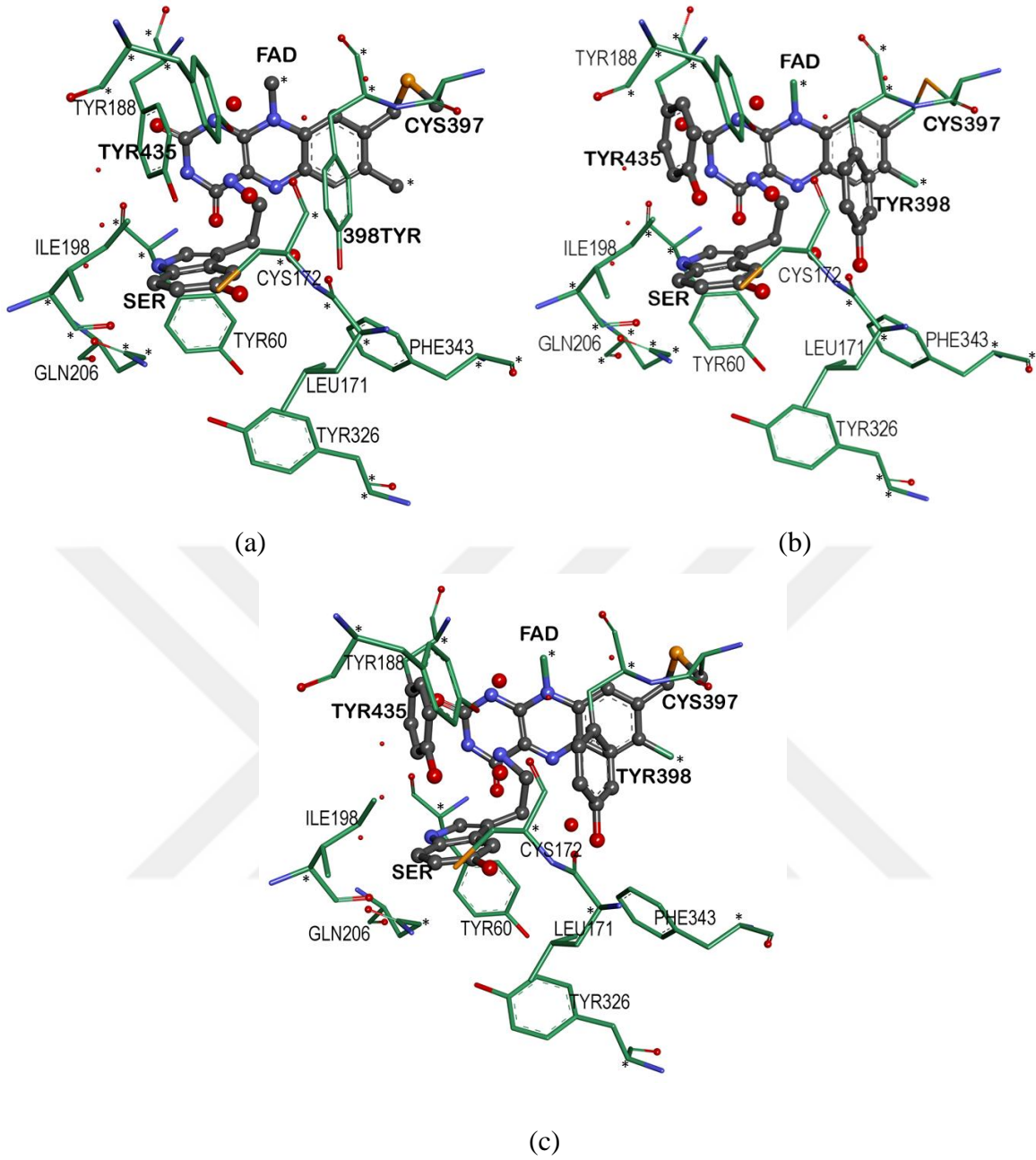
2.2.2. ONIOM Seviyelerinin Belirlenmesi

ONIOM seviyeleri belirlenirken model yapılar 2 katmana ayrılarak ONIOM optimizasyonlarında yüksek seviyeli katmana dahil edilen kısımlar 3 farklı şekilde (shl, lhl ve lhl-cys) ele alınmıştır:

- ~ MODEL X-shl (MODEL small high layer, X:II, IV, V) olarak tanımladığımız az sayıda (substrat + flavin + 3H₂O + Cys397(kismen)) yüksek seviye atom içeren yapı üzerine çalışmalar (Şekil 2.4.a).
- ~ MODEL IV-lhl (MODEL large high layer) olarak tanımladığımız daha fazla sayıda (substrat + flavin + Tyr398 + Tyr435 + 3H₂O) yüksek seviye atom içeren yapı üzerine çalışmalar (Şekil 2.4.b).
- ~ MODEL IV-lhl-cys (MODEL IV large high layer-sistein(kismen)) olarak tanımladığımız en fazla sayıda (substrat + flavin + Tyr398 + Tyr435 + 3H₂O + Cys397(kismen)) yüksek seviye atom içeren yapı üzerine çalışmalar (Şekil 2.4.c).



Şekil 2.3. (a) MODEL IIa aktif bölge amino asitleri ve flavinde koordinantları dondurulmuş atomlar (* ile gösterilmiştir). (b) ONIOM yönteminde kullanılan iki seviye (yüksek seviyedeki atomlar gri-top, düşük seviyedeki atomlar yeşil-çubuk olarak gösterilmiştir. Görüntü sadeliği açısından H atomları gösterilmemiştir.)

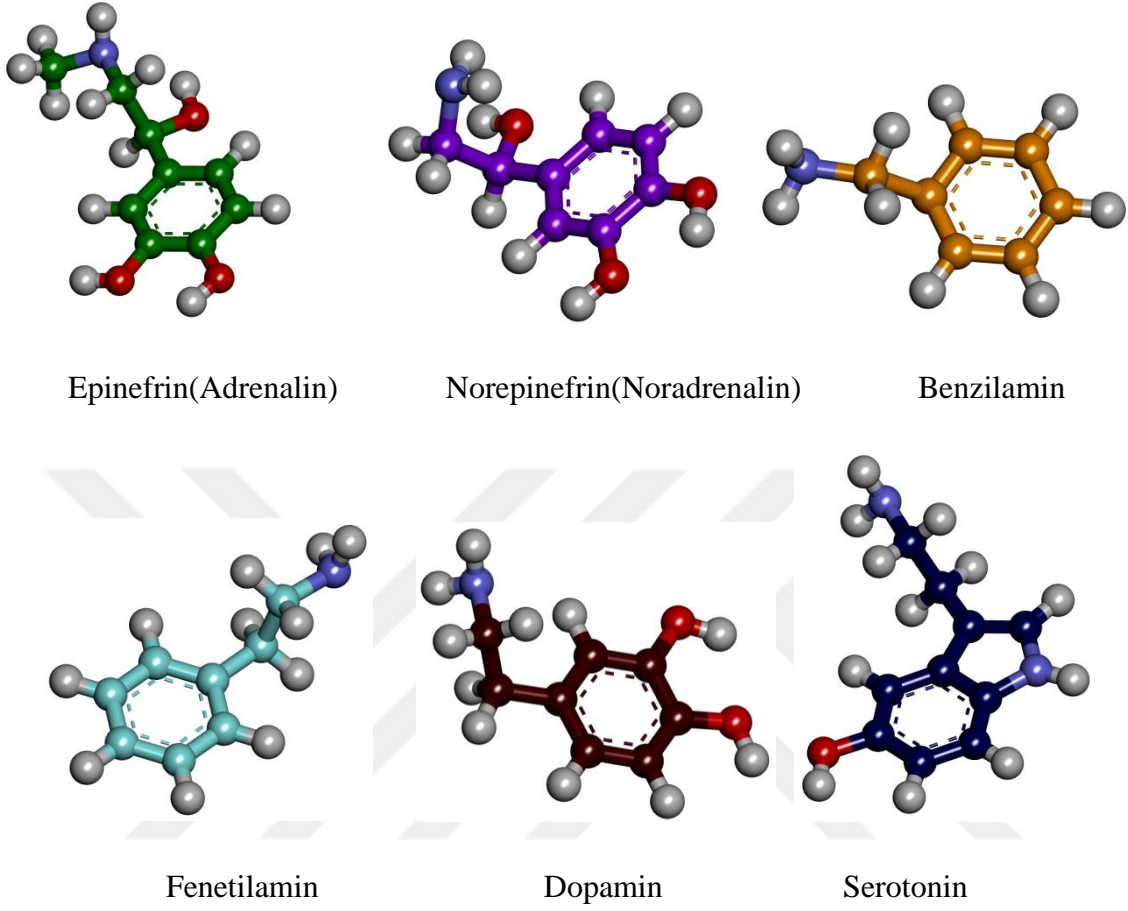


Şekil 2.4. (a) MODEL IV-shl (b) MODEL IV-lhl (c) MODEL IV-lhl-cys yapılarının üç boyutlu görüntüsü. (Koordinatları dondurulmuş atomlar (*) ile gösterilmiştir. Yüksek seviyeli katmana alınan atomlar gri-top, düşük seviyedeki atomlar yeşil-çubuk gösterilmiştir. Görüntü sadeliği açısından H atomları gösterilmemiştir).

2.2.3. Çalışılan Substratlar

Substrat olarak enzimin doğal substratları olan serotonin, dopamin, epinefrin (adrenalin), norepinefrin (noradrenalin), fenetilamin ve benzilamin tercih edilmiştir (Şekil 2.5). Daha önceki çalışmalarımızda (Akyüz ve Erdem, 2013) benzilamin ve fenetilamin substratları kullanılmış ve bu çalışmaların devamı niteliğinde olan modelleme çalışmaları ile bulunan

sonuçlar kıyaslanmıştır. Epinefrin, norepinefrin ve serotonin substratları ise yapılan literatür çalışmaları ışığında teorik olarak daha önce hiç modellenmemesi sebebiyle tercih edilmiştir.

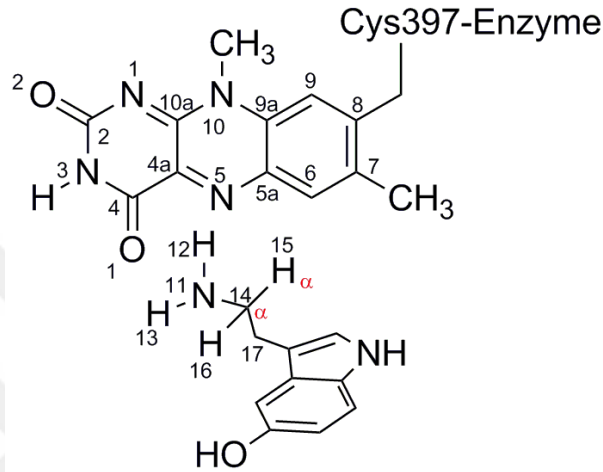


şekil 2.5. Çalışılan substratların  boyutlu görüntüleri

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. MODEL I ile Gerçekleştirilen Çalışmalar: Nörotransmitter Aminlerin Oksidasyonunun Modellenmesi

Serotonin, dopamin, adrenalin, noradrenalin, benzilamin ve fenetilamin nörotransmitterleri için MODEL I (Şekil 3.1) olarak tanımladığımız flavin+substrat yapısı polar nükleofilik (Edmondson, 2004) ve hidrür transfer (Fitzpatrick, 2004) mekanizmaları modellenmiştir.



Şekil 3.1. MODEL I (flavin+substrat) yapısındaki önemli atomların numaralandırılması

Polar nükleofilik mekanizmanın (Şekil 1.1.c) geçiş konumu ve/veya C4a ara ürünü HF ve YFT yöntemleriyle optimize edilemediğinden (Erdem vd., 2006) her iki mekanizma da PM6 yöntemi (Stewart, 2008) ile modellenmiş ve substratların mekanizma tercihleri incelenmiştir. PM6 parametrizasyonunun özellikle protein yapılarının modellenmesinde oldukça başarılı olduğu bilinmektedir (Stewart, 2009). Daha önceki çalışmalarımızda da MAO kataliz mekanizmalarına uygulanmış ve YFT yöntemlerine çok yakın aktivasyon enerjileri (yaklaşık 3 kkal/mol daha yüksek) hesaplayarak başarılı olduğu tespit edilmiştir (Atalay ve Erdem 2013). Diğer yandan, YFT yöntemleri ile polar nükleofilik mekanizmanın C4a ara ürünü optimize edilememekte ve doğrudan ürün kompleksine dönüşmektedir. Bu nedenledir ki son teorik çalışmalarda mekanizmanın tipi (hidrür veya proton transferi) hakkında literatürde çelişkili yorumlar yapılmaya başlanmıştır (Vianello vd., 2012; Abad vd., 2013, Repic vd., 2014, Zenn vd., 2015). Bu bağlamda çalışmada, her iki mekanizmayı da modelleyebilen ve karşılaştırma olanağı sunan tek yöntem olarak PM6 kullanımı tercih edilmiştir. PM6 yöntemi ile yapılan hesaplamalardan elde edilen sonuçlar Tablo 3.1 ve Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Nörotransmitterlerin MODEL I için PM6 yöntemi ile modellenen polar nükleofilik mekanizmasına ait ΔG_1^\ddagger :1. Basamağın Gibbs aktivasyon enerjisi, ΔG_2^\ddagger : 2. Basamağın Gibbs aktivasyon enerjisi, ΔG Reaksiyonun Gibbs serbest enerjisi, ZPE düzeltilmiş 1. aktivasyon enerjisi (ΔE_1^\ddagger), ZPE düzeltilmiş 2. aktivasyon enerjisi (ΔE_2^\ddagger) ve ZPE düzeltilmiş reaksiyon enerjileri (ΔE) (kcal/mol)

	ΔG_1^\ddagger	ΔG_2^\ddagger	ΔG	ΔE_1^\ddagger	ΔE_2^\ddagger	ΔE
Serotonin	39.9	a	10.3	37.8	a	9.2
Dopamin	34.8	26.6	-6.8	31.8	23.7	-11.4
Adrenalin	33.7	25.1	8.7	30.7	21.8	7.0
Nordarenalin	32.7	22.9	13.1	29.3	19.9	11.7
Benzilamin	36.6	25.9	-8.3	31.9	21.8	10.1
Fenetilamin	38.7	a	12.7	35.3	a	-13.5

a: 2. Geçiş konumu yapısı optimize edilememiştir.

Tablo 3.2. Nörotransmitterlerin MODEL I için PM6 yöntemi ile modellenen hidrür transfer mekanizmasına ait Gibbs serbest aktivasyon enerjileri (ΔG^\ddagger), ZPE düzeltilmiş aktivasyon enerjileri (ΔE^\ddagger), reaksiyonların Gibbs serbest enerjileri (ΔG) ve ZPE düzeltilmiş reaksiyon enerjileri (ΔE) (kcal/mol)

	ΔG^\ddagger	ΔG	ΔE^\ddagger	ΔE
Serotonin	35.2	-11.4	34.3	-14.6
Dopamin	29.6	-4.0	29.7	-3.5
Adrenalin	37.1	11.4	33.5	9.5
Nordarenalin	35.9	-8.2	33.1	-11.8
Benzilamin	34.5	2.8	31.5	1.3
Fenetilamin	35.4	-6.7	32.2	-10.9

Tüm substratlar için hidrür transferi (Şekil 1.1.a) ve polar nükleofilik (Şekil 1.1.c) mekanizmanın hız belirleme basamağı modellenenmiş ve kıyaslama yapılabilmektedir. Enerji bariyerleri kıyaslandığında ΔG^\ddagger (hidrür) (29.6-37.1 kkal/mol) aralığında, ΔG^\ddagger (polar) ise (32.7-39.9 kkal/mol) aralığında değişmektedir. Her ne kadar değerler birbirine yakın olsa da, adrenalin ve noradrenalin hariç genellikle tercih edilen mekanizmanın hidrür transferi olduğu görülmektedir. Adrenalin ve noradrenalin'nin polar nükleofilik mekanizmayı tercih etmesinin sebebi amin α C atomuna (C14) bağlı olan -OH grubunun elektron çekme özelliğinden dolayı enerji bariyerini düşürmesinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Çünkü, Şekil 1.1.c'de görüldüğü gibi hız belirleme basamağındaki TS1 ve C4a-ADD yapılarında α C üzerinde elektron yoğunluğu artmaktadır. Bu elektron yoğunluğunun azalmasını sağlayan faktörler yapıların kararlılığını arttırır. Nitekim, söz konusu nörotransmitter aminlerin α C atomuna elektron çekici gruplar (F, Cl, Br) bağlanarak gerçekleştirilen modellemelerde tüm substratlar için mekanizma tercihi polar nükleofilik mekanizma yönünde olmuştur (Engin vd., 2014). İki mekanizmayı birbirinden ayıran en önemli özellik α H (H15) in N5 e transfer olduğu hız belirleme basamağında TS yapılarındaki N11-C4a mesafeleridir. Polar nükleofilik mekanizmaya ait TS yapılarında N11-C4a mesafesi 1.65-1.68 Å aralığında, hidrür transferi mekanizmasında ise 2.40-2.59 Å aralığında değişmektedir (Tablo 3.3). Diğer taraftan, nörotransmitter'a bağlı olarak son ürünün değişiklik gösterdiği, mekanizmalarda (Şekil 1.1.a ve c) önerilen ürün kompleksini her zaman vermediği saptanmıştır.

Polar nükleofilik mekanizma ile serotonin ve fenetilamin haricinde tüm substratlar için C4a ara ürünü ve 2. Geçiş konumu basamağı modellenenmiştir. Serotonin ve fenetilaminde ise C4a ara ürünü yerine ürün kompleksi (PC) elde edilmiştir. 2. geçiş konumundan sonraki son ürünler ise adrenalin ve noradrenalin için ürün kompleksi iken dopamin ve benzilamin için α C ile N5 mesafesinin 1.6 Å'e kısaldığı N5'e bağlı ara üründür (N5-ADD).

Hidrür transferi mekanizması ile son ürün olarak serotonin, fenetilamin ve noradrenalin için N5 ara ürünü oluştururken, dopamin adrenalin ve benzilamin için ürün kompleksine dönüşmüştür. Bu çalışmalar sonucunda; MAO kataliz mekanizmasının substrat yapısına göre değişiklik gösterebileceği, tek basamaklı veya iki basamaklı olabileceği öngörülmüştür. Ancak MODEL I yapılarında enzim çevresinin stabilizasyon etkisinin bulunmadığı dikkate alınmalıdır. Gaz fazında yapılan MODEL I hesaplamalarında zwitteriyonik N5-ADD ve C4a-ADD yapılarının iyon kompleksi olan PC yapılarından daha kararlı olması beklenen bir durumdur. Enzim içinde ise bu durum değişebilir.

Tablo 3.3. Nörotransmitterlerin MODEL I için PM6 yöntemi ile elde edilen geçiş konumu (TS) yapılarına ait önemli bağ uzunlukları (Å) ve ürün/araürün tercihleri (PC/N5-ADD/C4a-ADD)

	Hidrür			Polar		
	C4a-N11	C14-N5	Ürün tercihi	C4a-N11	C14-N5	Ürün tercihi
Serotonin	2.54	2.56	N5-ADD	1.67	2.50	PC
Dopamin	2.55	2.59	PC	1.67	2.50	PC
Adrenalin	2.58	2.57	PC	1.67	2.49	C4a-ADD
Noradrenalin	2.40	2.55	N5-ADD	1.68	2.50	C4a-ADD
Benzilamin	2.48	2.55	PC	1.68	2.49	C4a-ADD
Fenetilamin	2.49	2.57	N5-ADD	1.68	2.50	PC

3.2. MODEL IIa ile Gerçekleştirilen Çalışmalar

Daha önceki çalışmalarımızda (Atalay ve Erdem, 2013; Akyüz ve Erdem, 2013) yapılan TS optimizasyonlarından sonra IRC hesaplarının bazı durumlarda N5'e bağlı ara ürüne bazı durumlarda ise doğrudan ürün kompleksine götürdüğü tespit edilmiştir. N5-kovalent araürününün oluşması üzerinden ilerleyen 2 basamaklı hidrür transferi mekanizması Vianello vd. (2012) tarafından (dopamin + flavin + Tyr398 + Tyr435 + Tyr188 + 4H₂O) kümesinin M06-2X/6-31G(d) optimizasyonlarına dayanarak önerilmiştir. Ancak, bizim tespitimize göre, kataliz sırasında N5-kovalent araürününün oluşup oluşmayacağı hassas bir konu olup aktif bölgedeki amino asitler, su molekülleri, kullanılan YFT fonksiyoneli gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Yeterince büyük bir aktif bölge kümesi kullanıldığında PC iyon komplekslerinin kararlılığı arttığından IRC hesapları sonucu doğrudan ürün kompleksi optimize edilmektedir. Yani, bir araürün oluşmaksızın kataliz tepkimesi tamamlanmaktadır. Diğer yandan, N5-C14 arasına kovalent bir bağ manuel olarak oluşturularak verilen başlangıç yapısı da kararlı bir araürün (N5-ADD) olarak optimize edilebilmektedir. Bu gözlemlerimiz ve aşağıda anlatılan sonuçlarımız PC ve N5 yapıları arasında bir denge reaksiyonu olabileceğini düşündürmektedir. Bu amaçla gerçekleştirilen çalışmalar ışığında hidrür transferi mekanizması modifiye edilerek çok basamaklı bir modifiye mekanizma önerilmiştir.

3.2.1. Modifiye Hidrür Transfer Mekanizması

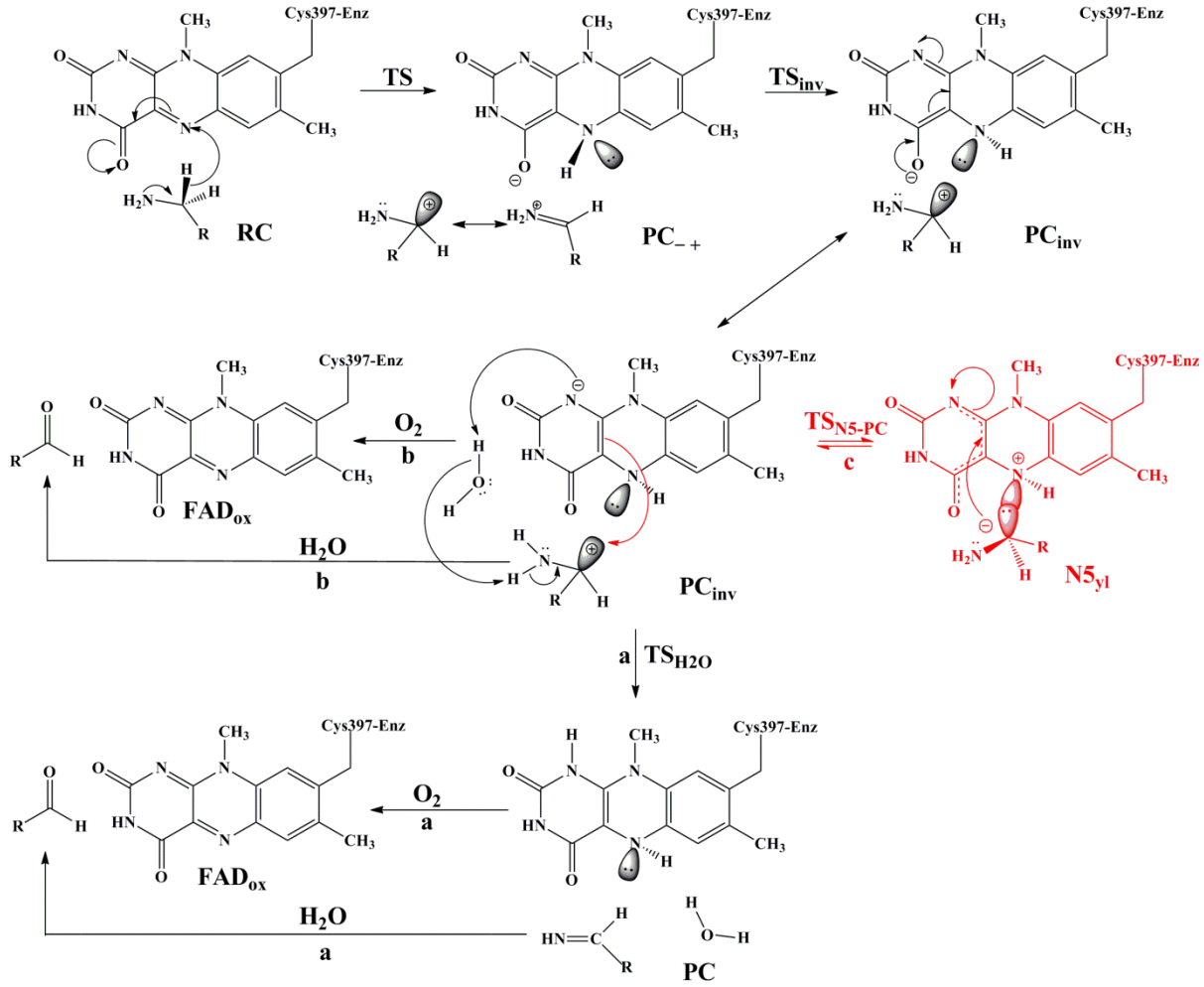
Hidrür transferi mekanizması MODEL Ila ile serotonin substratı kullanılarak incelenmiştir. Söz konusu mekanizmaya göre ilk basamakta nörotransmitterin αC 'undan αH 'in flavin N5'e göç etmesi sonucunda PC_{+} iyon kompleksi oluşmuştur. Eş zamanlı olarak bir elektron çifti de substratın amino grubundan flavine transfer olmuş ve sonuç olarak indirgenmiş flavin ve oksitlenmiş substrat (iminyum katyonu) oluşmuştur. PC_{+} kompleksi yeterli kararlılığa sahip olamazsa azot inversiyonu ile, transfer olan αH flavinin re-yüzünden si-yüzüne doğru yönlendirken N5'in bağ yapmamış elektron çifti de flavinin re-yüzüne geçerek PC_{inv} iyon kompleksini oluşturur. (Şekil 3.2). Flavın üzerinde biriken negatif yük genellikle karbonil oksijeni O1 veya N1 etrafında delokalize olurken; substrattaki pozitif yük ise amin azotu N11 ve αC (C14) üzerinde delokalize olur.

Yapılan çalışmalar sonucunda mekanizmanın üç farklı mekanizma yolu (**a**, **b**, **c**) üzerinden ilerleyebileceğini önermekteyiz (Şekil 3.2). Şekil 3.2'de gösterilen **a** yoluna göre flavin N5 atomu PC_{inv} iyon kompleksi oluşturmak üzere çevrime uğradıktan sonra son basamakta PC_{inv} iyon kompleksi iminyum grubundan bir kristal su molekülünün proton alıp-vermesi ile flavine bir proton transfer ederek en son PC nötral iminin oluşmasını sağlamıştır. Oluşan PC nötral imin kolaylıkla uzaklaşarak aktif bölgeden çıkar ve non-enzimatik olarak hidroliz olup aldehite dönüşür. Bu sırada flavin halkası ise O_2 molekülüyle tekrardan yükseltgenir.

Mekanizmanın ilerleyebileceği diğer bir yolunda ise (**b** yolunda), PC_{+} ya da PC_{inv} formundaki iminyum katyonunun aktif bölgedeki su molekülleri yardımıyla direkt hidrolize uğraması sonucu aldehite ve FAD'in de moleküler oksijen ile tekrar okside flavin formuna geçmesi olasılığı söz konusudur.

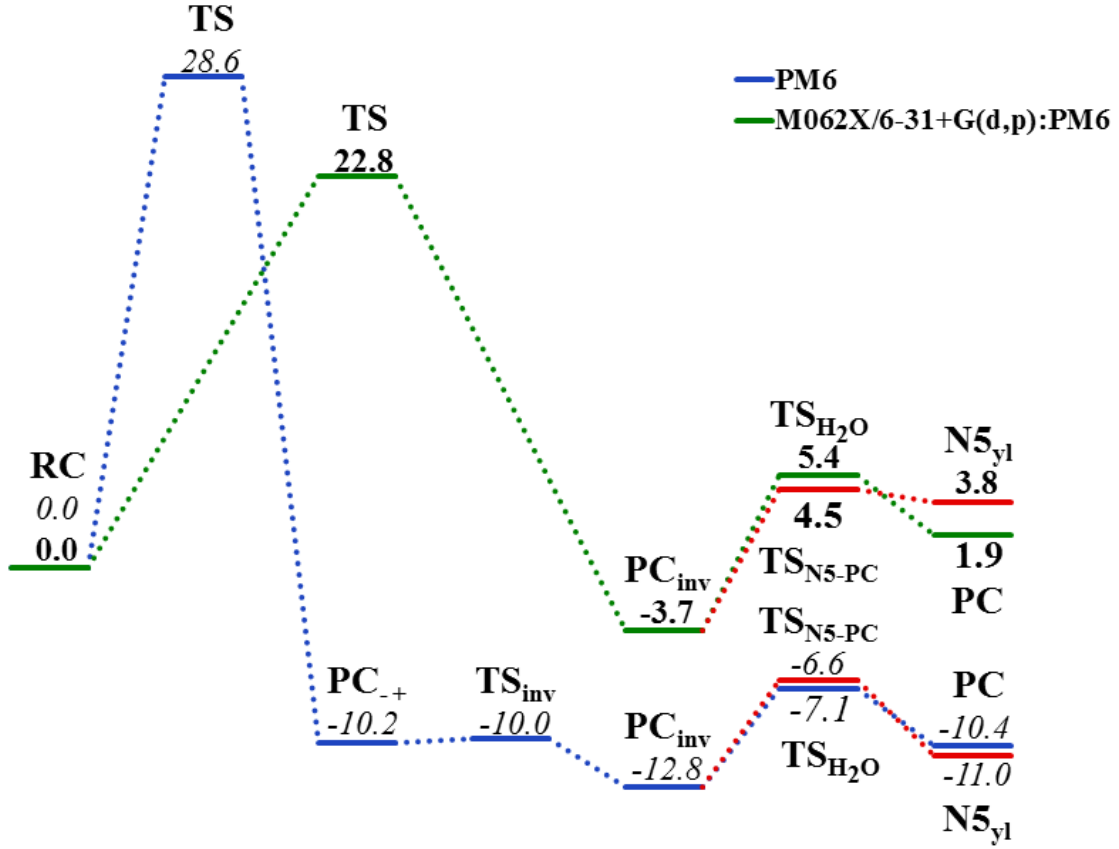
Mekanizmanın en önemli basamak PC_{inv} iyon kompleksi oluşumu basamağıdır. Çünkü flavin ve substrat arasındaki redoks reaksiyonu bu basamakta gerçekleşmektedir. PC iyon kompleksleri yeterli miktarda kararlılaştırılmadığı takdirde flavin N5 ile substrat C14 arasındaki çekim üstün gelerek **c** yolu üzerinden N5 ara ürününü (aslında bu bir azot yilididir) oluşturur ($N5_{yl}$). Böylelikle flavin üzerindeki elektron yoğunluğu, N5 ortaklanmamış elektron çifti üzerinden, yükseltgenmiş substrat ile paylaşılır. Diğer taraftan, Bölüm 3.2.2'deki NBO yük dağılımı tarafından desteklendiği gibi, $N5_{yl}$ oluşumu, flavin-substrat indirgenme yarı reaksiyonunu geri çevirir. Çünkü substrat, αC - αH bağ kırılma basamağında flavine transfer edilmiş elektronları kısmen geri kazanır ve bunun sonucunda enzim aktivitesinin yani FAD

indirgenmesinin azalması beklenir. Enzim kataliz reaksiyonunun tamamlanabilmesi için, N5_{yl} araürününün elektronlarını tekrar flavine vererek PC_{inv}'e geri ayrışması gerekir.



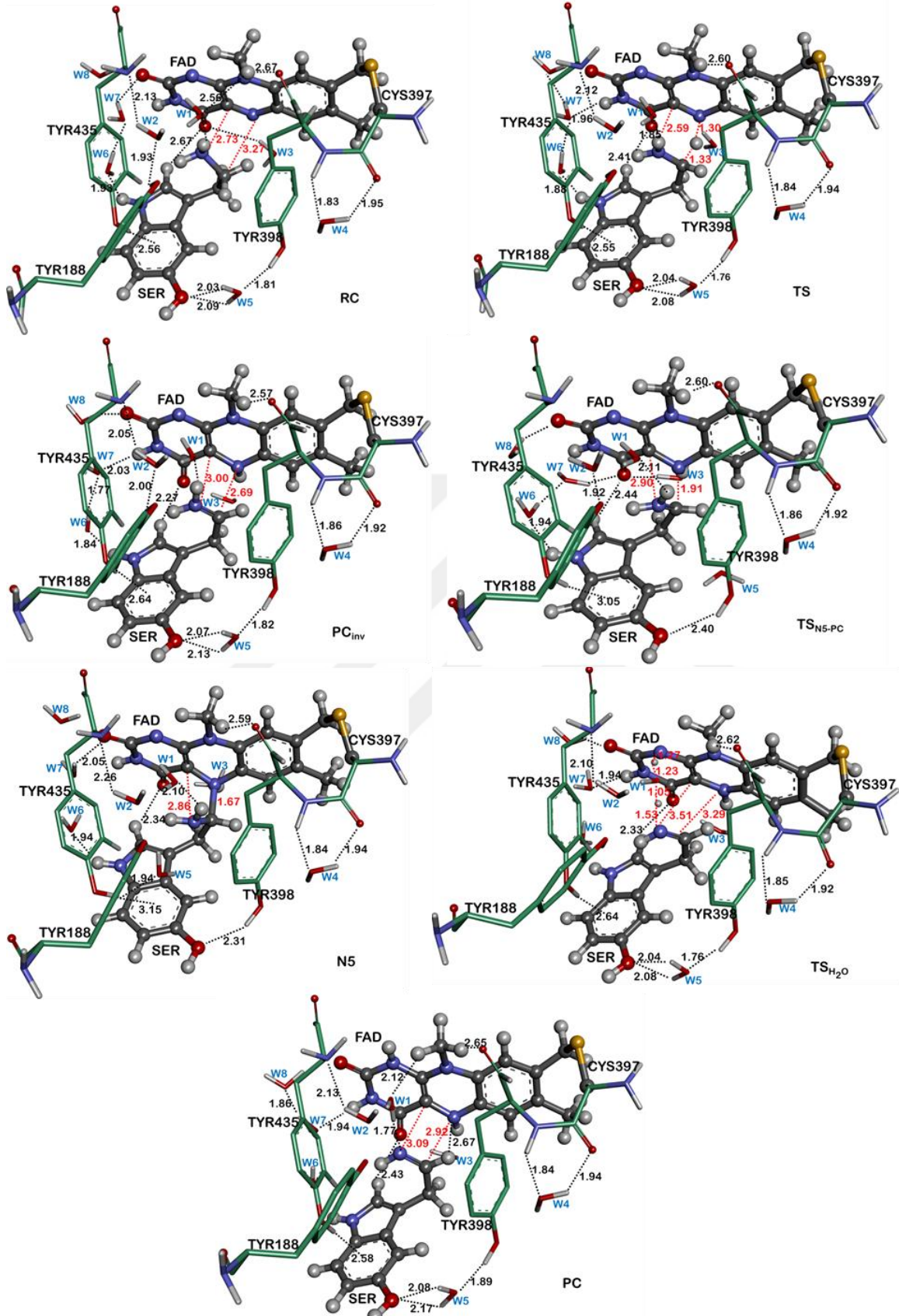
Şekil 3.2. Tarafımızdan önerilen, MAO katalizinde kovalent geri dönüşümlü inhibisyon basamağı (c yolu) içeren modifiye hidrür transferi için alternatif basamaklar (a, b)

Bu mekanizma için PM6 ve ONIOM (M06-2X/6-31+G(d,p):PM6) hesaplamaları ile elde edilen reaksiyon enerji profili Şekil 3.3'te karşılaştırılmıştır. ONIOM (M06-2X/6-31+G(d,p):PM6) metodu ile optimize edilen yapıların 3 boyutlu görüntüleri Şekil 3.4'te verilmiştir. Sadece PM6 metodu ile önerilen mekanizmadaki tüm yapıları karakterize edilebilmiştir. Bu nedenle bütün PM6 optimize yapıları üzerine tek nokta M06-2X/6-31+G(d,p) enerji hesaplamaları da gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.4).



Şekil 3.3. Reaksiyon koordinatı boyunca MODEL-IIa için modifiye hidrür transferi mekanizmasına ait relatif Gibbs serbest enerji değerleri (kcal/mol). (Yeşil çizgi ONIOM(M06-2X/6-31+G(d,p):PM6) yöntemi sonuçlarını, mavi çizgi PM6 sonuçlarını, kırmızı çizgi ise N5_{y1} kovalent bağlı geri dönüşümlü inhibisyon basamağını göstermektedir.)

Şekil 3.3'te görüldüğü üzere, $\alpha\text{C}-\alpha\text{H}$ bağının ayrıldığı ilk basamak reaksiyon koordinatı boyunca en yüksek ΔG^\ddagger değerine sahip olduğundan reaksiyonun hız belirleme basamağıdır (Miller ve Edmondson, 1999; Walker ve Edmondson, 1994). Bu basamaktaki Gibbs serbest enerji engeli (22,8 kkal/mol-ONIOM metoduna göre) MAO'nun benzilamin, fenetilamin ve dopamin (Vianello vd., 2012; Akyüz ve Erdem 2013) ile yapılan hesaplamalı çalışmalarının yanısıra diğer flavoenzimlerin hidrür transferi bariyerleri ile de uyuşmaktadır (Kong vd., 2011; Karasulu vd., 2013; Karasulu ve Thiel, 2015).



Şekil 3.4. MAO'nun serotonin ile oksidasyonundan ONIOM(M062x/6-31+G(d,p):PM6) yöntemiyle reaksiyon koordinatı boyunca MODEL Iia-shl yapısı ile elde edilen optimize yapılar. (Etkileşim uzunlukları Å biriminden verilmiştir.)

M06-2X/6-31G(d,p) metodu ile doğal enzim model yapıları üzerine uygulanan tek nokta enerji hesapları enerji bariyerini 22.8'den 20.5 kkal/mol'e düşürmüştür (Tablo 3.4). Sırasıyla oksijen ve hava saturasyonlarında MAO-B ile gerçekleştirilen kinetik deneylerde reaksiyon hızları 17.44 kkal/mol ve 17.81 kkal/mol olarak ölçülmüştür (Edmondson vd., 1993). Bu değerlerin hesaplamalı olarak bulduğumuz bariyer ile uyum içerisinde olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca son zamanlarda LSD1 ve MTO gibi diğer amin oksidasyonundan sorumlu flavoenzimler ile gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilen aktivasyon bariyerleri de elde ettiğimiz teorik sonuçlara benzerdir. QM(B3LYP-D2/6-31G(d))/CHARMM metodu ile tüm sistemin simülasyon hesaplamaları sonucu LSD1 ve MTO için elde edilen serbest aktivasyon enerjileri sırasıyla 20,9 ve 21,3 kkal/mol'dür (Karasulu vd., 2013; Karasulu ve Thiel, 2015).

Tablo 3.4. MODEL Iia-shl için hesaplanan Relatif Gibbs serbest enerji ΔG (kkal/mol) değerleri

	PM6	M06-2X/ 6-31+G(d,p):PM6	CPCM ^c //M06-2X/ 6-31+G(d,p)//PM6
RC	0.0	0.0 (0.0) ^a	0.0
TS	28.6	22.8 (20.5) ^a	22.2
PC₋₊	-10.2	b	3.1
TS_{inv}	-10.0	b	2.5
PC_{inv}	-12.8	-3.7	-1.5
TS_{N5-PC}	-6.6	4.5	-5.5
N_{5yl}	-11.0	3.8	2.8
TS_{H20}	-7.1	5.4	3.6
PC	-10.4	1.9	1.1

^aTüm sistemde M06-2X/6-31G(d,p)//M06-2X/6-31+G(d,p):PM6 metodu ile tek nokta enerji hesaplamaları. ^bTS_{inv} basamağı gerçekleşmeden doğrudan PC_{inv} optimizasyonu gerçekleşmiştir. ^cCPCM metodu ile enzim çevresi için dielektrik sabiti $\epsilon=4$ alınarak tek nokta enerji hesaplamaları gerçekleştirilmiştir.

Ayrıca, Tyr435Phe mutant modelleri kullanılarak aynı metotlar ile doğal enzim ve mutant enzim sonuçları kıyaslanmıştır. Tyr435Phe mutant modeli için hız belirleme basamağının Gibbs serbest aktivasyon enerji bariyeri 23.4 kkal/mol olarak hesaplanmış ve doğal enzime göre 0.6 kkal/mol daha yüksek olduğu görülmüştür. Deneysel olarak da, MAO-A enziminin serotonin ile katalizinde O₂ varlığında gerçekleştirilen Tyr444Phe mutantlarının kataliz hızının, doğal enzimin kataliz hızından daha yavaş olduğunu göstermiştir (Nandigama vd., 2001). Fakat farklı MAO formları ile hesaplamalı ve deneysel verilerin doğrudan kantitatif olarak kıyaslanması mümkün olmayacağından sadece fenilalanin ve tirozinin yer değiştirmesinin hızı azalttığı söylenebilir.

PM6 sonuçları değerlendirildiğinde, N5 çevriminin gerçekleştiği basamak oldukça küçük bir enerji bariyerini aşarak gerçekleşmektedir (0,2 kkal/mol). Bu nedenle ONIOM (M06-2X/6-31+G(d,p):PM6) metodu ile TS_{inv} basamağı optimize edilememektedir. $\alpha C-\alpha H$ bağ kırılma basamağı (TS) yapısından başlanan IRC hesaplamalarında doğrudan PC_{inv} iyon kompleksi elde edilmiştir. Bu sonuca dayanarak N5 çevriminin eşzamansız olarak ilk basamakla beraber gerçekleştiği söylenebilir. PC_{inv} oluşurken substrat iminyum katyonuna yükseltgenirken FAD ise anyonik FADH'a indirgenir ve indirgenme redoks reaksiyonu tamamlanmış olur.

Pozitif yüklü iminyum bileşiğinin aldehite hidroliz olmadan MAO aktif bölgesinden ayrılması oldukça zordur (Edmondson vd., 1993; Woo ve Silverman, 1995). Çünkü π -katyon etkileşimleri ile aromatik kafeste tutunması beklenir. Bu sebeple reaksiyonun son basamağında iminyum katyonunun flavin N1'e su molekülü yardımıyla proton transferi sonucunda nötr imine dönüşmesi gerekmektedir. Bu basamağın gerçekleşmesi için aşılması gereken enerji engeli 9.1 kkal/mol'lük küçük bir engeldir.

PC_{inv} iyon kompleksi için alternatif bir basamak ise TS_{N5-PC} geçiş konumu üzerinden flavin N5-yilidinin oluşumudur. Bu basamak için de Gibbs serbest enerji ONIOM (M06-2X/6-31+G(d,p):PM6) ve PM6 metotları ile sırasıyla 8.2 kkal/mol ve 6.2 kkal/mol olarak hesaplanmış ve kolaylıkla gerçekleşebileceği görülmüştür. Öte yandan bu yilidin PC_{inv} 'a geri dönebilmesi için gereken geri-aktivasyon enerjileri ONIOM (M06-2X/6-31+G(d,p):PM6) ve PM6 metotları ile yapılan hesaplamalar sonucunda sırasıyla 0.7 and 3.8 kkal/mol olarak bulunmuş ve oluşabilecek $N5_{yl}$ araürünün kolay bir şekilde tekrar PC_{inv} e dönüşebileceği sonucuna varılmıştır. ONIOM (M06-2X/6-31+G(d,p):PM6) metodu ile geri dönüşüm reaksiyonu düşünüldüğünde aslında aşılması gereken bir bariyer bulunmamaktadır ve $N5_{yl}$, PC_{inv} 'den 7.5 kkal/mol daha az kararlıdır. Bu veriler birlikte değerlendirildiğinde yilidin oluşur oluşmaz tekrar iyon kompleksine ayrışacağı ve $N5_{yl}$ oluşumunun oldukça kısıtlı olacağı görülmektedir. PC_{inv} iyon kompleksine ayrışmanın gerçekleşmesinden sonra, yukarıda bahsedilen kristal su üzerinden nötr PC kompleks ürünü oluşmaktadır.

Tablo 3.5'te verilen hesaplanmış bağ uzunlukları, yukarıda bahsedilen kimyasal değişiklikleri destekler niteliktedir. Hız belirleme basamağında pro-R αH 'nin amin N11 eşleşmemiş elektron çiftlerini αC 'a aktarmasıyla birlikte flavin N5 atomu üzerine aktarımını, C14-H15 mesafesi uzayıp N5-H15 mesafesinin kısılması ile eşzamanlı olarak N11-C14 mesafesi yavaş yavaş 1.46 Å (RC)'dan 1.36 Å (TS)'a ve daha sonra 1.28 Å (PC_{inv})'a kısalarak N11=C14 iminyum çift bağı oluşmasını kanıtlamaktadır. En önemli bağ mesafesi proton transfer (polar

nükleofilik) mekanizması ile hidrür transfer mekanizmasını ayırt etmeye yardımcı olan N11-C4a mesafesidir.

Tablo 3.5. ONIOM (M062x/6-31+G(d,p):PM6) metodu ile MODEL IIa-shl için hesaplanan bağ mesafeleri (Å).

	RC	TS	PC_{inv}	TS_{N5-PC}	N5_{yl}	TS_{H2O}	PC
C14-H15	1.10	1.33	3.02	2.42	2.22	3.54	3.22
N5-H15	2.62	1.30	1.02	1.03	1.04	1.02	1.02
N11-C4a	2.73	2.59	3.00	2.90	2.86	3.51	3.09
N5-C14	3.27	2.55	2.69	1.91	1.67	3.29	2.92
N5-C4a	1.29	1.35	1.42	1.44	1.45	1.41	1.41
N11-C14	1.46	1.36	1.28	1.33	1.38	1.27	1.27
N1-C10a	1.32	1.33	1.35	1.34	1.34	1.37	1.38
C4-C4a	1.50	1.46	1.41	1.41	1.42	1.42	1.42
C4-O1	1.21	1.23	1.26	1.26	1.25	1.25	1.24
N11-H12	1.02	1.02	1.05	1.02	1.02	1.53	1.77
H12-O_{w1}	2.02	1.85	1.65	2.11	2.10	1.05	1.00
O_{w1}-H_{w1}	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	1.23	2.66
H_{w1}-N1	2.20	2.16	2.12	2.20	2.20	1.27	1.01

Vinello vd. (2012) tarafından önerilen iki basamaklı hidrür mekanizması (Şekil 1.1.b) ile bizim önerdiğimiz mekanizma arasındaki temel farklılık PC_{inv} iyon kompleksinin oluşumudur. Vianello vd. (2012) ve Repic vd. (2014) bu kompleksi optimize edememişler ve yerine flavin N5 araürünü (N5 Adduct) olarak adlandırdıkları yapıyı elde etmişlerdir (Biz buna N5_{yl} demekteyiz). Repic ve grubunun gerçekleştirdiği çalışmada kullanılan modelde aktif bölgede dört su molekülü ve Tyr398, Tyr435, Tyr188 amino asit kalıntıları bulunmaktadır (Peptid omurgasındaki atomlar yapıya dahil değildir). Gaz fazında veya küçük model yapılar içinde iyon kompleksinin kararlı kalabilmesi mümkün olmadığından daha kararlı kalabilen N5 araürünü elde ettiklerini düşünüyoruz.

Akyüz ve Erdem tarafından (2013) gerçekleştirilen 10 amino asit ve 8 aktif bölge kristal suyu içeren MAO-A ONIOM(QM:QM) optimizasyonları 3 farklı YFT fonksiyoneli kullanılarak ürün kompleksi oluşmasını sağlamıştır. Böylece kümeleme hesaplamaları ile belirlenen enzimin aktif bölgesinde iyon kompleksi yapısının daha kararlı olduğunu kanıtlamıştır. Önceki çalışmalarımıza benzer şekilde, 8 su molekülü içeren bu çalışmada da ileri yöndeki

IRC hesaplamalarında doğrudan PC_{inv} iyon kompleksi elde edilmiştir. Diğer taraftan $N5_{yl}$ yapısı manuel olarak oluşturulup, daha sonrasında geometri optimizasyonları ile yapı optimize hale getirildiğinde elde edilen enerjiler PC_{inv} iyon kompleksinin daha karalı olduğunu göstermiştir. Şekil 1.1.b'de gösterilen iki basamaklı hidrür transfer mekanizmasının ikinci basamak geçiş konumu optimize edilmeye çalışılmıştır. Fakat Vianello ve grubunun (2012) önersine göre, $N5$ araürünün nötral ürün kompleksine ayrışması, iki su molekülü ile flavin $N1$ amin azotuna proton göçünün eşzamanlı olarak gerçekleştiği belirtilmesine karşın, bizim bütün çabalarımıza rağmen böyle bir eş zamanlı geçiş konumu yapısı optimize edilememiştir; optimizasyonlar sırasında önce flavin $N5$ -amin $C14$ mesafesi (3.29 \AA) açılmıştır. Sanal frekans animasyonu amin $N11$ - $H12$, $H12$ - O_{W1} ve H_{W1} -flavin $N1$ bağlarına ait gerilme titreşimi gösterirken $N5$ - $C14$ arasında bir gerilme titreşimi gözlemlenmemiştir. Çünkü $N5$ - $C14$ mesafesi çok uzundur (3.29 \AA). Bu şekil 1.1.b'de önerilen iki basamaklı hidrür transferi mekanizmasının aksine, $N5_{yl}$ yapısının $N5$ - $C14$ bağ açılması ile aminden flavin $N1$ atomuna proton transferinin eş zamanlı olmadığını açıkça göstermektedir. Yani aminden flavin $N1$ 'e proton transfer olmadan önce $N5$ - $C14$ bağ ayrılmasının ayrı bir basamakta meydana geldiğini düşündürmüştür. Bu yüzden grubumuz tarafından mekanizma için $N5_{yl}$ yapısından PC_{inv} yapısına geri ayrılan yeni bir basamak önerilmiştir (Şekil 3.2.c). Ayrıca, aminden flavin $N1$ 'e proton transfer basamağını iki su molekülü yerine tek su molekülü ile modelledik çünkü tek su molekülü (Şekil 3.2) için Gibbs serbest enerji bariyerinin iki su molekülü ile modellenen bariyerden 4.1 kkal/mol daha düşük olduğu görülmüştür.

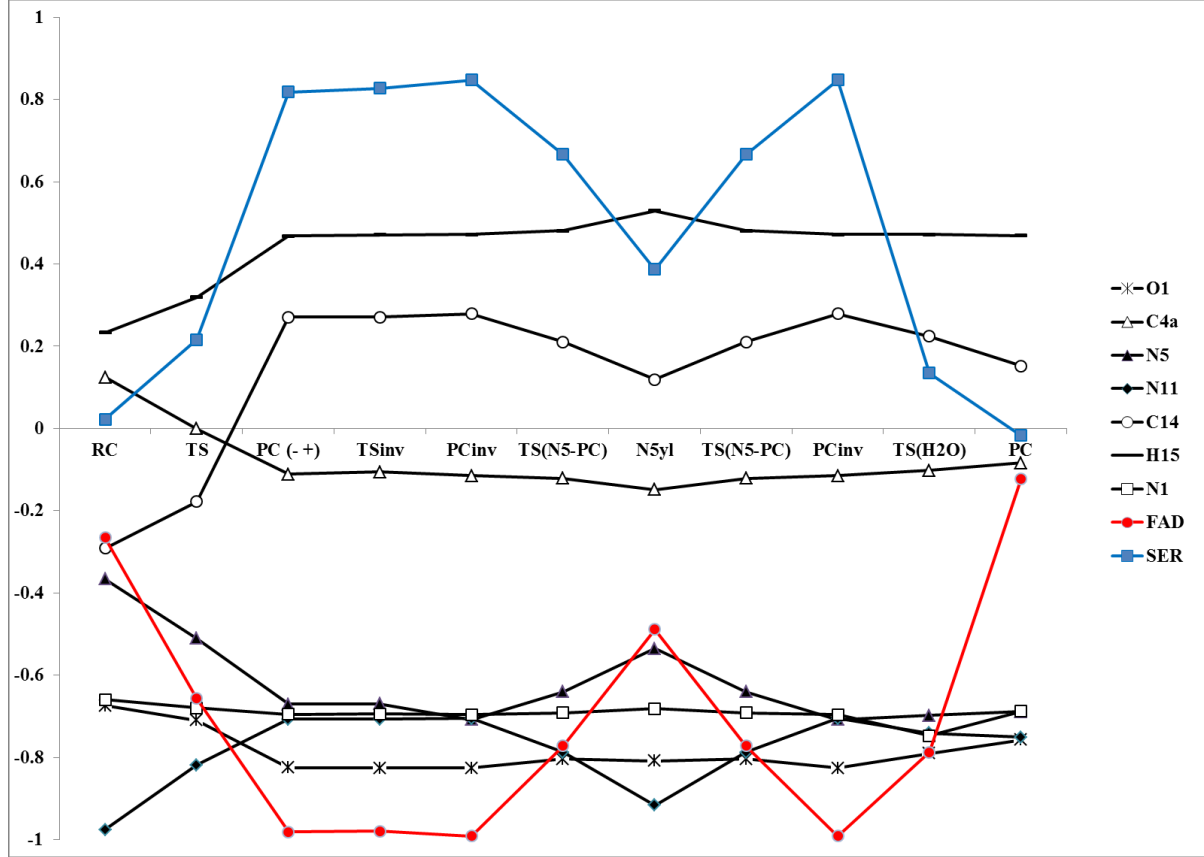
3.2.2. $N5$ Yilid Oluşumu İnhibisyon mu Kataliz Basamağı mı?

MAO kataliz mekanizmasının nasıl gerçekleştiğini aydınlatmak için reaksiyon koordinatı boyunca optimize yapılarda geometrik parametreler (Tablo 3.5) ve NBO yük dağılımları (Şekil 3.5) incelenmiştir. Reaksiyon RC yapısından TS ve daha sonrasında PC_{+} iyon kompleksine doğru ilerlerken amin N ($N11$)'nin yükü 0.3 birim azalmıştır. Çünkü $N11$ elektronlarının bir kısmını αC 'a aktararak αC - αH arasındaki bağın zayıflamasına yardımcı olmuştur. Eş zamanlı olarak RC'ten PC_{+} iyon kompleksine doğru αH elektronlarıyla birlikte hidrür olarak Flavin $N5$ 'e transfer olduğundan αC üzerindeki yük 0.6 birim azalmıştır. Buna karşın eğer αH proton olarak flavin $N5$ 'e göç etmiş olsaydı αC 'nin elektron yoğunluğunun artması beklenirdi. Sonuç olarak αH 'nin elektronik yükü 0.2 birim azalırken $N5$ atomunun 0.3 birim artmıştır. $N5$ üzerinde bulunan elektron yoğunluğunun bir kısmının konjugasyon ile flavin $O1$ ve $N1$ atomlarında delokalize olması beklenir. (Şekil 3.5)'te gözlemlendiği gibi, $O1$ 'in elektronik yükü 0.15 birim artarken $N1$ 'deki artış gözardı edilebilecek miktardadır.

Şekilde görüldüğü üzere literatür çalışmalarındaki görsellerin aksine elektron delokalizasyonu N1'den daha çok O1 atomuna doğrudur. Tablo 3.5'te RC'den PC_{inv} iyon kompleksine doğru ölçülmüş olan bağ mesafeleri C4-O1 mesafesinin 0.05 Å (1.21 Å'dan 1.26 Å'a) uzadığını fakat C10a-N1 mesafesinin ise nispeten daha az uzadığını (0.03 Å) doğrulamaktadır. PC₊ iyon kompleksinin olduğu basamak indirgenme reaksiyonunun tamamlandığı basamaktır. Serotonin ve FAD'ın toplam elektronik yükleri de bunu desteklemektedir. FAD'ın elektronik yükü (kırmızı eğri) 0.8 birim (-0.2'den -1.0'e) artarken serotoninin elektronik yükü (mavi eğri) 0.8 birim (0.0'den 0.8'e) azalmıştır. Sonuç olarak serotonin yükseltgenerek iminyum katyonunu oluştururken FAD ise indirgenmiştir. N5 inversiyonunun gerçekleştiği adımda ise önemli bir yük değişimi yaşanmamıştır. N5_{yl} yapısına gelindiğinde elektronik yüklerde büyük bir değişimin meydana geldiği görülmüştür. PC_{inv}-N5_{yl} düzenlenmesinde αC ve N11 üzerindeki elektron yoğunluğu 0.2 birim artmış; eş zamanlı olarak flavin N5, O1, N1 ve C10 atomlarındaki elektronik yüklerde 0.2 birimlik bir azalma meydana gelmiştir. Bu flavin halkasının N5 aracılığıyla αC'a elektronlarını aktardığının bir göstergesidir. Optimize N5_{yl} yapısında αC-N5 arasındaki bağ mesafesi 1.69 Å olarak ölçülmüştür. Böyle bir elektronik yapının literatürde örnekleri bulunan ve N-C bağ uzunluğunun 1.56 Å olarak hesaplandığı azot yilidi yapısına benzediği görülmüştür (Dixon vd., 1983; Naito vd., 1994). Azot yilitlerinde N atomunun formal yükü + iken azota direk bağlı olan C atomunun formal yükü – dir (Pandey vd., 2006).

PC_{inv} yapısından N5_{yl} yapısına geçiş sırasında FAD ve substrat üzerindeki elektronlar oldukça yoğun bir şekilde değişmektedir. Şekil 3.5'de görüldüğü gibi substrat üzerindeki toplam elektron yoğunluğu 0.4 birim (+0,8 den +0,4'e) artarken FAD üzerindeki elektron yoğunluğu 0.5 birim (-1,0'dan -0,5'e) azalmaktadır. Elektron yoğunluğundaki bu büyük farklılık birinci basamakta transfer olan elektronların yaklaşık olarak yarısının geri yönde taşındığını göstermektedir. Başka bir deyişle birinci basamakta substrattan flavine aktarılan elektronların bir kısmını FAD bu basamakta substrata geri aktarmaktadır. Sonuç olarak FAD'ın yarı indirgenmiş substratın ise yarı yükseltgenmiş formu oluşmaktadır. Böylelikle N5_{yl} oluşumu gerçekte FAD indirgenme reaksiyonunun etkisini kısmen yok etmekte ve enzimin aktivitesini geciktirmektedir. Bu yüzden Şekil 3.2.c yolu (kırmızı) aslında indirgenmiş flavin ile yükseltgenmiş substrat arasındaki bir geri-redoks basamağıdır ve bu reaksiyon sayesinde mekanizma bazlı inhibitörlerin tasarımı mümkün olabilir. Protein veri tabanındandaki çeşitli inhibitörler ile MAO enzim kristal yapıları bu öneriyi desteklemektedir. Çünkü bu yapıların

büyük bir kısmında (39 pdb yapısından 19'u) inhibitor flavin N5 atomuna kovalent olarak bağlı bulunmaktadır (Bonivento vd., 2010; Bonivento ve Mattevi, 2008; Li vd., 2006).



Şekil 3.5. MODEL Iia-shl için CPCM/M062X/6-31+G(d,p)//PM6 metodu ile gerçekleştirilen hesaplamalardan elde edilen flavin halkası ve serotonin'in NBO toplam yükü ile önemli atomlara ait NBO yüklerinin reaksiyon koordinatı boyunca değişimi. (FAD toplam yük yoğunluğu: kırmızı, Serotonin toplam yük yoğunluğu: mavi.)

Şekil 3.2'deki N5_{yl}-PC_{inv} ayrışması basamağı enzimin aktivitesini geri kazandırmaktadır. Son basamak amin N11'den flavin N1'e proton transferi basamağıdır ve bu basamak sonunda nötral serotonin ve nötral flavin oluşmaktadır.

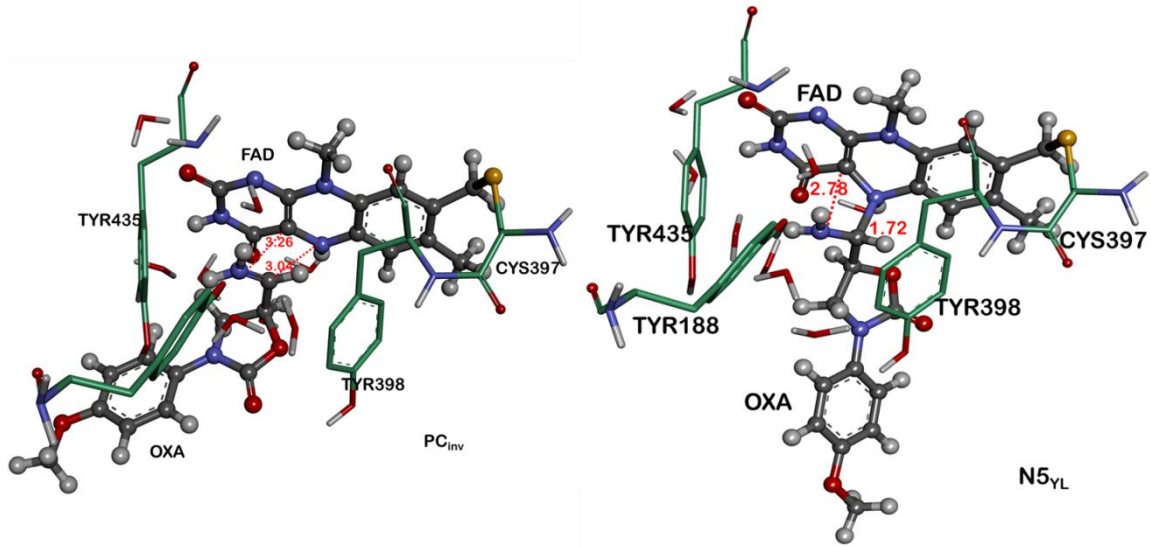
3.2.3. Kovalent Geri Dönüşümlü İnhibitörlerin Mekanizma Bazlı Akılcı Tasarımı

Kovalent bağlı inhibitörler düzenli olarak vücuda verilme gereksinimi olmayan yüksek ve uzun süreli kalıcı etkiye sahip inaktivatörlerdir. Buna karşın kovalent bağlı inhibitörler genellikle toksik ve istenmeyen yan etkilere sebebiyet verip geri dönüşümsüz olarak biyolojik hedeflerin aktivitelerini geciktirdiklerinden tercih edilmemektedirler. Bu nedenle geri

dönüşümlü kovalent inhibitörler tasarlamak proteinlerin kalıcı modifikasyonlarının yarattığı olumsuz sonuçları ortadan kaldırmak ve üstün tedavi imkanları yaratabilmek için oldukça önemlidir (Singh vd., 2011). Son yıllarda kovalent bağlı inhibitörlere olan ilgi önemli ölçüde artmıştır. Fakat burada en önemli sorun inhibitörlerin tasarımının yapılması ve etkilerinin araştırılmasındaki uygulamalardır (Singh vd., 2011; Mah vd., 2014). Tarafımızdan önerilen inhibisyon mekanizmasının bu açıdan önemli olduğu ve MAO için kovalent geri dönüşümlü mekanizma bazlı ilaç tasarımına uygun hale getirilebileceğini düşünüyoruz.

Bölüm 3.2.2.'de anlatıldığı gibi c yolu üzerinden oluşan N5 yilidi mekanizma bazlı inhibisyona neden olmaktadır. Bu durumun mantıklı izahı şudur: Serotonin gibi iyi substratlarda PC_{inv} iyon kompleksi N5_{yl} araürününden daha kararlı yapıda olmalıdır. Bundan kaynaklı olarak, geri aktivasyon bariyerinin daha düşük olması beklenir. Buna karşın, mekanizma bazlı güçlü bir inhibitörde N5_{yl} araürününün daha kararlı yapıda ve bu yüzden de geri reaksiyon aktivasyon bariyerinin daha yüksek olması inhibisyon etkinliğini artırır. Başka bir deyişle, enzim inhibisyonunun nedeni N5_{yl} araürününün kararlılığıdır. Çünkü ne kadar kararlı bir yilid oluşursa geri aktivasyon enerjisi yükselecek ve enzimin geri dönme hızı (FAD'ın geri indirgenmesi) o kadar yavaşlayacaktır.

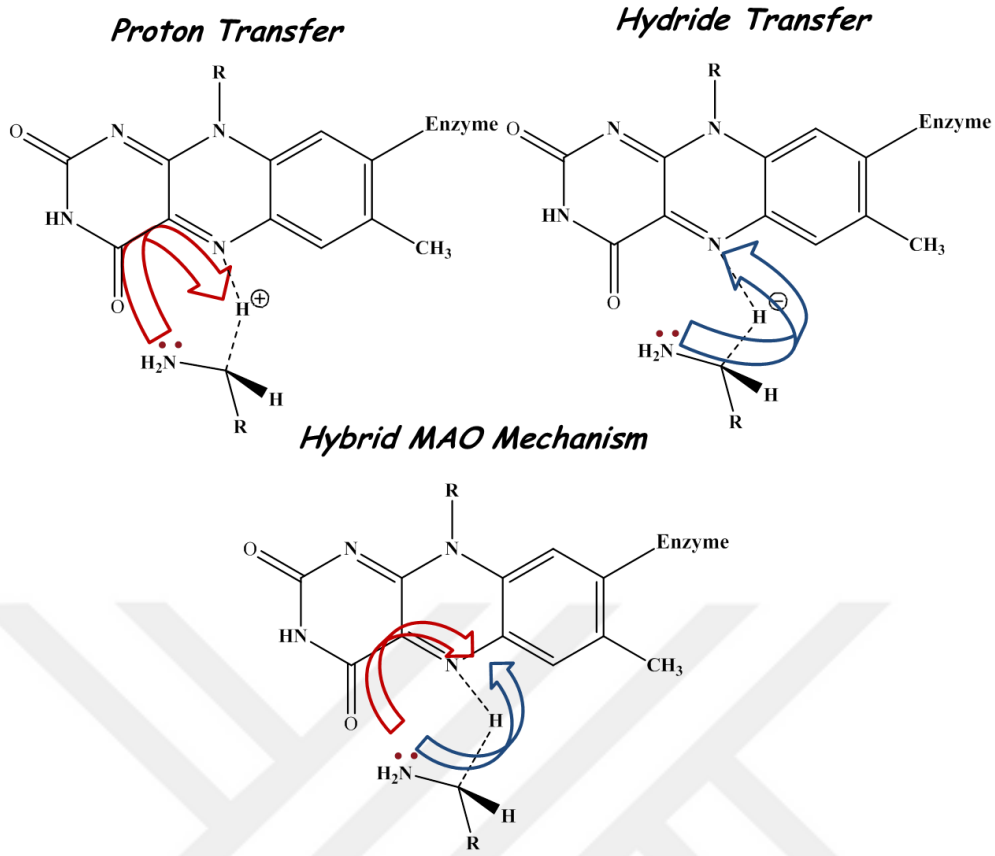
Bu önerimizi test etmek için MAO-B'nin iyi bilinen zamana bağımlı inaktivatörü olan 5-(aminometil)-3-(4-metoksifenil)-2-oksazolidinon (Şekil 3.6) için Şekil 3.2.c yolundaki termodinamik denge modellenmiştir (Silverman vd., 1993; Erdem vd., 2014; Silverman, 1995). 5-(aminometil)-3-(4-metoksifenil)-2-oksazolidinon'un PC_{inv} ve N5_{yl} yapıları serotonin ile yapılan hesaplamalarda kullanılan metot olan (M06-2x/6-31+G(d,p):PM6) ile tasarlanmıştır. Hesaplanan Gibbs serbest enerjileri c yolundaki dengenin 2.5 kkal/mol daha ekzergonik olduğunu ortaya koymuştur. Çünkü N5_{yl}, PC_{inv} iyon kompleksinden daha kararlıdır. Buna karşın serotonin için aynı denge 7.5 kkal/mol daha endergoniktir ve N5_{yl}, PC_{inv} iyon kompleksinden çok daha kararsızdır. Bu veriler ışığında kararlı N5_{yl} oluşumu ile MAO için kovalent bağlı inhibisyon önerimiz desteklenmiştir. Önerdiğimiz bu inhibisyon mekanizmasının, bileşik yapılarındaki akılcı modifikasyonlar ile, kovalent bağlı mekanizma bazlı ilaçların geri dönüşümlü ve daha etkin hale getirilebilmesi ve daha güçlü yeni inhibitörlerin tasarımı için kullanılabilirliğini düşünüyoruz.



Şekil 3.6. 5-(aminometil)-3-(4-metoksifenil)-2-oksazolidinon inaktivatörünün ONIOM (M062x/6-31+G(d,p):PM6) yöntemiyle MODEL Ila-shl için elde edilen PC_{inv} ve N5_{yl} optimize yapıları. (Değerler Å biriminden verilmiştir.)

3.2.4. Hidrür Transferi İle Proton Transferi Mekanizmalarının Karşılaştırılması

Tek adımlı reaksiyonda amin azotu üzerindeki eşleşmemiş elektron çiftinin flavin C4a'dan N5 atomuna doğru (polar nükleofilik/proton transferi) saat yönünde mi yoksa α C üzerinden N5'e (hidrür transferi) saat yönünün tersinde mi hareket ettiğini anlamak oldukça güçtür (Şekil 3.7). Proton transferinde flavin N5 üzerindeki elektron yoğunluğu birikimi nükleofilik karakteri artırır ve böylece pro-R α H proton olarak aktarılır. Bu durumda α proton ve aminin eşleşmemiş elektron çifti birbirinden ayrı olarak taşınır ve eşleşmemiş elektron çiftinin hareket yönü ile α H'nin hareketi birbirlerine terstir. Hidrür transferinde ise α C- α H bağ ayrılması ile α C'da elektron birikir ve böylece elektron çifti ve proton aynı yönde hareket ederek bağın elektronları ile α H flavin N5 atomuna transfer olur. Bu iki mekanizmayı ayırt etmek için en önemli geometrik parametre amin N11-flavin C4a mesafesidir. İki basamaklı proton transferinde (Erdem vd., 2006, Atalay ve Erdem 2013) bu mesafe geçiş konumu yapısında N11-C4a araürün yapısına benzer şekilde oldukça azalmaktadır. Tek basamaklı proton transferinde ise araüründeki N11-C4a bağ oluşması ve ayrılmasının aynı basamakta (Erdem vd., 2006) eş zamansız (asynchronous) olarak yani bağ oluşmadan amin N'dan Flavin C4a'ya yük aktarımı gerçekleşerek meydana geldiği farzedilmektedir (Abad vd., 2013). Buna dayanarak proton transfer mekanizmasında (Şekil 1.1.d) geçiş konumu yapısındaki N11-C4a mesafesinin hidrür transferi mekanizmasına benzemesi ve iki basamaklı proton transferi mekanizmasındaki (Şekil 1.1.c) mesafeden daha uzun olması beklenmektedir.



Şekil 3.7. MAO'nun amin oksidasyon mekanizmasında substrattan FAD'a elektronların saat yönünde ve saat yönünün tersine hareketi.

Son zamanda MAO-B için benzilamin kullanılarak yapılan QM/MM çalışmasından alınan reaksiyon kesitlerinde (snapshots) N11-C4a mesafesinin giren kompleksinde 2.52 Å, geçiş konumunda ise 2.56 Å olduğu belirlenmiş ve bu sonuçlara dayanarak hidrür transferi ve tek basamaklı proton transferi karışımı bir mekanizma önerilmiştir (Abad vd., 2013). Giren kompleksindeki nispeten kısa bağ mesafesi bir miktar yükün C-H bağ kırılması olmadan önce transfer olduğu ve bunun sonucunda mekanizmanın kısmen polar nükleofilik karakter taşıdığı şeklinde yorumlanmıştır. Bu öneri daha sonra *p*-OH ve *p*-NO₂ benzilamin bileşikleri için benzer QM/MM hesaplamaları ile desteklenmiştir (Zenn vd., 2015).

Grubumuz tarafından gerçekleştirilen son gaz fazı hesaplamalarında ise proton transfer ve hidrür transferi mekanizmalarında benzer aktivasyon bariyerleri elde edilmiştir (Atalay ve Erdem, 2013). Son olarak Zapata-Torres ve grubu (2015) tarafından MAO-B için M06-2X/6-31G(d,p) yöntemi ile kuantum kümeleme yaklaşımı hesaplamaları yapılmıştır. Çıkan sonuçlara göre *p*-NO₂ benzilaminin oksidasyonunda geçiş konumu yapısındaki N11-C4a mesafesi 2.53 Å iken bu mesafe benzilamin ve fenetilamin için 2.9 Å olarak bulunmuştur. *p*-

NO₂ benzilamindeki C4a-N11 mesafesinin nispeten kısa olması mekanizmanın polar nükleofilik karakter taşıdığı, benzilamin ve fenetilamindeki mesafenin nispeten uzun olması ise hidrür transferi karakteri olarak yorumlanmıştır. Ancak, N11-C4a mesafesinin enzim çevresi, substrat çeşidi, kullanılan hesaplama metodu gibi çeşitli faktörlerden etkilendiği de unutulmamalıdır.

Benzilamin ile yapılan çalışmalarda, klasik YFT fonksiyoneli B3LYP geçiş konumu yapısındaki N11-C4a mesafesini 2.7-3.0 Å aralığında hesaplarken (Erdem vd., 2006; Atalay ve Erdem, 2013; Akyüz ve Erdem, 2013) dispersiyon etkisi eklenmiş YFT metotları CAMB3LYP, WB97XD, M06-2X bu mesafeyi sırasıyla 2.65 Å, 2.63 Å ve 2.59 Å olarak hesaplamıştır. (Akyüz ve Erdem, 2013). Hidrür transfer mekanizmasına uyan diğer amin oksidasyonundan sorumlu flavoenzimlerde bu önemli mesafe MTO enzimi (Karasulu ve Thiel, 2015) için 3.18 Å ve LSD1 enzimi (Karasulu vd., 2013) için ise 2.9 Å olarak hesaplanmıştır. MTO ve LSD1 enzimlerinde bu mesafenin göreceli olarak daha uzun olması, MAO'nun substratlarında bulunmayan fakat bu enzimlerin substratlarındaki aminlere bağlı metil grupları ile flavin C4a arasındaki sterik etkileşimin varlığından kaynaklanmaktadır. Bu bilgiler üzerine, biz serotonin mekanizmasını detaylı olarak araştırdık. Tablo 3.5 incelendiğinde, N11-C4a mesafesi RC için 2.73 Å'tan αH'nin flavin N5 atomuna göç ettiği TS yapısında 2.59 Å'a kadar azalmış son olarak PC yapısında 3.00 Å çıkmıştır. Bu substratın flavine yaklaşarak flavin N5 atomunun pro-R αH'e kolaylıkla saldırmasına yardımcı olacak şekilde amin N11 ile flavin C4a arasında istemli bir etkileşim olduğunu göstermektedir (Şekil 3.4). Elde edilen bulgular yine de hidrür transfer mekanizmasına oldukça benzerdir. RC'ten TS'ye devam edildiğinde αC'daki NBO negatif yükün (0.11) kısmen azalması bu benzerliği kanıtlar niteliktedir (Şekil 3.5). Çünkü bu reaksiyon proton transfer reaksiyonu olsaydı αC elektron yoğunluğunun artması beklenirdi.

Mekanizmanın nasıl gerçekleştiğini anlamak için MODEL Iia-shl geçiş konumu üzerine molekül içindeki yük transferlerini ve konjugasyonlarını analiz etmekte kullanılan NBO ikinci dereceden pertürbasyon teorisi analizi (Rubarani vd., 2014) uygulanmış ve sonuçları incelenmiştir (Tablo 3.6).

Tablo 3.6. MODEL IIa-shl geçiş konumu üzerine M062X/6-31G(d,p)/(M062X/6-31+G(d,p):PM6) metodu ile gerçekleştirilen NBO ikinci dereceden pertürbasyon teorisi analizinde önemli donör-akseptör etkileşim enerjileri^a.

Donör NBO (i)	Akseptör NBO (j)	E(2) kkal/mol	E(j)-E(i) a.u.	F(i,j) a.u.
Flavin halkası içinde				
BD N5-H15	LP C4a	46.69	0.30	0.133
BD N5-H15	BD* C5a-C6	15.08	0.50	0.077
LP C4a	BD* N1-C10a	139.05	0.16	0.146
LP C4a	BD* C4-O1	81.95	0.19	0.131
LP C4a	BD* N5-H15	21.61	0.41	0.099
LP N5	BD* N5-H15	15.35	0.69	0.097
BD N5-H15	LP C14	109.75	0.31	0.202
Substrattan flavin halkasına				
LP C14	BD* N5-H15	153.73	0.40	0.266
LP N11	LP C4a	20.94	0.16	0.065
Substrat içinde				
LP N11	LP C14	110.97	0.17	0.150

^a Mavi hidrür ve kırmızı polar mekanizmaya ait sonuçlar.

Tablo 3.6'daki donör-akseptör stabilizasyon enerjileri elektron göçünün yönü hakkında ipuçları sağlamıştır. Tabloda sadece 15 kkal/mol'den büyük stabilizasyon enerji değerleri verilmiştir. E(2) değerleri konjugasyon ve yük transferinin sağladığı kararlılığın miktarını gösterir. Amin N11'in ortaklaşmamış elektron çiftinden α C'nun ortaklaşmamış elektron çiftine elektronların aktarımı yapıya 110.97 kkal/mol'lük oldukça büyük bir kararlılık kazandırmıştır. α C ortaklaşmamış elektron çiftinden N5-H15 anti-bağ orbitallerine elektron aktarımı yapıda daha da büyük bir (153.73 kkal/mol) kararlılığın oluşmasını sağlamıştır. Bir başka önemli kararlılık (49,69 kkal/mol) oluşturan etkileşim ise N5-H15 bağ orbitallerinden flavin C4a'ya doğru elektron transferidir. Bu etkileşimlerde (mavi renk) tıpkı hidrür transferinde (Fitzpatrick, 2004) olduğu gibi (Şekil 3.7) elektron taşınımının yönü saat yönünün tersine doğrudur ve amin N11'den α C'a ve daha sonrasında flavin N5-H15'ten C4a'ya doğru olduğu görülmektedir. Buna karşın elektronların saat yönünde göç etmesi de yapıya çeşitli kararlılıklar kazandırmıştır (Şekil 3.7). Elektronların saat yönünde hareketinden

kaynaklı yapıya kazandırdıkları kararlılıklar (kırmızı renk) elektronların amin N11'den flavin C4a'ya (20,94 kkal/mol), C4a'dan N5-H15'e (21.61 kkal/mol), N5-H15'ten α C'a (109.75 kkal/mol) doğru hareket etmesinin sonucudur. N11 başlangıç noktası olarak göz önüne alınacak olursa saat yönündeki 20,94 kkal/mol'lük daha küçük kararlılığa kıyasla saat yönünün tersine 110.97 kkal/mol'lük daha büyük kararlılık yük transferinin amin N11'den flavin C4a yönüne doğru olduğunu göstermektedir. Mekanizmanın polar nükleofilik (Edmondson vd., 2004) karakteri zayıf olmasına karşın bu veriler aynı zamanda her iki mekanizmanın da var olduğunu doğrular niteliktedir ve bu durum literatürdeki birçok çelişkili sonucu izah etmektedir.

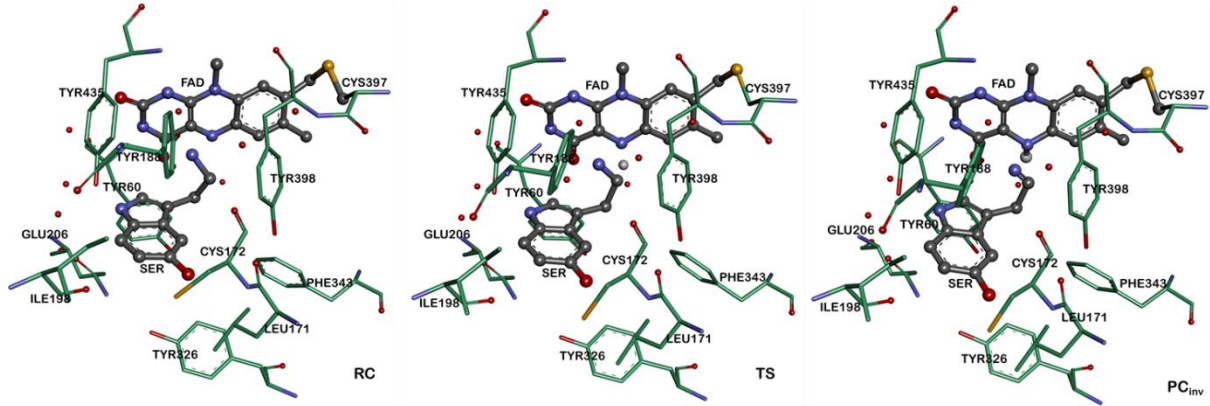
3.2.5. Büyük Model/Kovalent Bağlı Ve Bağımsız FAD

FAD kofaktörü Flavinin C-8 α pozisyonundan MAO-A'da Cys406, MAO-B'de ise Cys397 amino asit uçlarına kovalent olarak bağlıdır (Kearney vd., 1971; Nagy ve Salach, 1981; Miller ve Edmondson, 1999). MAO ve diğer bazı flavin içeren enzimlerde FAD'ın kovalent bağlı olmasının işlevsel önemi flavoenzimlerin sadece %10'nun flavin kofaktörüne kovalent bağlı olmasından dolayı ilgi konusudur (Heuts vd., 2009). Kovalent bağlı flavoenzimlerin katalizi hızlandırarak FAD indirgenme potansiyelinin artmasına yardımcı olduğu düşünülmektedir (Sucharitakul vd., 2010).

Yapılan bir deneysel çalışmada MAO-A'da Cys406 ve MAO-B'de Cys397 amino asitleri Serin amino asidi ile mutasyona uğratıldığında enzimin aktivitesinin kaybolduğu açığa çıkmıştır (Wu vd., 1993). Buna karşın MAO-A'da Cys 406 amino asidinin alanin ile mutasyonunda ise doğal enzimin katalitik aktivitesine göre aktivitesi %50 oranında azalmış fakat aktivite tamamıyla yok olmamıştır (Hiro vd., 1993). Cys406Ala mutasyonunun katalitik aktivitesi kovalent bağlı olmayan Cys406Ala mutasyon sonuçları ile karşılaştırılmış ve kovalent bağımsız analog %10'dan az aktivite göstermesine karşın indirgenme-yükseltgenme potansiyeli normal flavin sonuçlarına benzer bulunmuştur. Bu sonuçlara bağlı olarak kovalent bağlı formun aktif bölgede kataliz etkisi üzerinde önemli olabileceği kanısına varılmıştır (Nandigama ve Edmondson, 2000).

Bu çalışmada MODEL IIa-shl sonuçlarımızı doğrulamak ve kovalent bağlı FAD'nin etkisini moleküler seviyede detaylı şekilde anlamak için daha büyük aktif bölgeye sahip MODEL IV-shl yapısı oluşturmuştur. Bu hesaplamalarda MODEL IIa-shl yapısında olduğu gibi kovalent bağlı (MODEL IV-shl, Tablo 3.7'de MODEL IV-cFAD olarak verilen) ve FAD C8a-Cys397

arasındaki bağ kırılarak oluşturulan kovalent bağısız (Tablo 3.7’de MODEL IV-nFAD olarak verilen) modeller kullanılmıştır (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. MAO'nun serotonin ile oksidasyonunda hız belirleme basamağının MODEL IV-shl için M06-2X/6-31+G(d,p):PM6 metodu ile elde edilen optimize geometri yapıları.

Tablo 3.7 sonuçlarına bakıldığında, kullanılan model ve seçilen yönteme bakılmaksızın kovalent bağısız tüm modellerde aktivasyon enerji bariyerleri doğal enzyme göre yüksek çıkmıştır. Özellikle M06-2X/6-31+G(d,p):PM6 yöntemi ile MODEL IV-nFAD için yapılan hesaplamalarda bariyer MODEL IV-cFAD'ın bariyerine göre 1.9 kkal/mol daha yüksek çıkmıştır ve bu da kataliz hızını 22 kat azaltmıştır.

Tablo 3.7. MODEL IIa-shl ve MODEL IV-shl yapıları için kovalent bağı(c-FAD) ve kovalent bağısız (nFAD) mutant modeller için relatif Gibbs serbest enerji hesaplamaları ΔG (kkal/mol).

	PM6		M06-2X/6-31+G(d,p):PM6			
	MODEL IV-cFAD	MODEL IV-nFAD	MODEL IV-cFAD	MODEL IV-nFAD	MODEL IIa-cFAD	MODEL IIa-nFAD
RC	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TS	25.1	26.1	22.5	24.4	22.8	24.1
PC_{inv}	-18.0	-14.8	-3.4	1.4	-3.7	-2.8
TS_{N5-PC}	-16.9	-14.1	-	-	4.5	2.0
N5_{yl}	-21.1	-17.2	0.3	2.0	3.8	1.5

MTO ile yapılan son QM/MM çalışmasında da hidrür transferi mekanizmasına göre Gibbs serbest aktivasyon enerjisi kovalent bağısız modelde 2.0 kkal/mol artmış ve bu önerilen değere uygunluk göstermiştir (Karasulu ve Thiel 2015). Dahası başka bir kovalent bağı flavoenzim (piranoz 2-oksidad) ile yapılan deneysel çalışmaya göre, doğal enzim ile mutasyona uğratan

kovalent bağırsız mutant enzimin indirgenme hızı yaklaşık olarak ~22 kat azalmıştır (Sucharitakul vd., 2010).

Kovalent bağırsız FAD'nin serbest aktivasyon enerjisindeki artışa mantıklı bir açıklama getirmek için kovalent bağılı-bağırsız geçiş konumu yapılarındaki önemli geometrik parametreler incelenmiştir (Tablo S1). N11-C4a mesafesi hariç tüm diğler bağı mesafeleri benzerdir. MODEL II-shl yapısında N11-C4a mesafesi (2.59 Å) MODEL IIa-nFAD-shl yapısındaki mesafeden (2.61 Å) 0.02 Å daha kısadır. Bununla birlikte MODEL IV-shl yapısındaki N11-C4a mesafesi (2.63 Å) ise MODEL IVnFAD-shl yapısındaki mesafeden (2.72 Å) 0.09 Å daha kısadır. Bu durum FAD'in kovalent bağılı olduğunda MAO kataliz hızının arttırması amin N11 ile flavin C4a arasındaki daha zayıf etkileşimden kaynaklandığını göstermektedir. Dihedral açılar (C9-C8-C7-C6, C9-C9a-C5a-C6, N10-C9a-C5a-N5, N1-C10a-C4a-C4, C9a-N10-C10a-C4a, C10a-C4a-N5-C5a, C5a-N5-C4a-C4) incelendiğinde kovalent bağılı izoalloksizan halkasının yaklaşık 4°-11° daha fazla düzlemden saptığı görülmüştür (Karasulu ve Thiel 2015). Benzer şekilde MTO flavo enziminde kovalent bağılı-bağırsız modeller içinde düzlemden sapmalar gözlemlenmiştir Bir diğler önemli geometrik parametre ise α C- α H-N5 açısıdır. Kovalent bağılı-bağırsız modeller arasındaki fark yaklaşık olarak (2.5°)'dir. MTO enzimiyle gerçekleştirilen çalışmada ise bu açı yaklaşık 3.0° olarak ölçülmüştür (Karasulu ve Thiel 2015).

3.3.Kuantum Kümeleme Yaklaşımı

Bu yaklaşım sayesinde, optimum bir aktif bölge modelinin hangi amino asit birimlerini içine alacağı belirlenirken aynı zamanda da her bir amino asit katmanının enzim katalizleme işlevine katkısını da izlenme olanağı bulunmuştur. Beş farklı model kullanılarak hidrür transferi mekanizması PM6 (Engin, 2015) ve ONIOM (M062X/6-31+G(d,p):PM6) yöntemleri ile benzilamin substratı kullanılarak modellenmiştir. Elde edilen aktivasyon bariyerleri ve reaksiyon enerjileri Tablo 3.8'de verilmiştir.

Tablo 3.8. PM6 ve ONIOM (M062X/6-31+G(d,p):PM6) yöntemleriyle optimize edilmiş model yapıların relatif Gibbs serbest enerjisi (ΔG), ZPE düzeltilmiş enerji (ΔE) değerleri (kkal/mol) ve α C-N5 atomları arası mesafeler(\AA) (ONIOM seviyelerinde MODEL X-shl kullanılmıştır.)

	PM6			ONIOM(M062X/6-31+G(d,p):PM6)		
	ΔG^\ddagger	ΔG	α C-N5 mesafe(\AA)	ΔG^\ddagger	ΔG	α C-N5 mesafe(\AA)
MODEL I	34.5	2.8	4.1	30.3	10.0	1.6
MODEL II	32.6	-14.3	1.6	24.2	-0.4	2.4
MODEL III	31.3	-1.9	3.8	28.6	8.3	5.1
MODEL IV	27.1	-10.1	3.9	25.0	-0.6	3.1
MODEL V	25.8	-13.8	4.0	25.0	-0.8	3.9

Model tanımları için Bölüm 2.2.1'deki Şekil 2.2'ye bakınız.

Optimum aktif bölge yapısını belirlerken literatür örneklerinde genelde elektronik enerjilerdeki azalma takip edilerek odaklanma noktası aranmaktadır. Tablo 3.8 incelendiğinde aktivasyon enerjisinde en önemli azalmanın MODEL III-shl'den MODEL IV-shl'e geçişte ortaya çıktığı görülmektedir. Bu bulgular aktif bölgenin hangi kısımlarının kataliz kinetiği üzerinde en büyük payı olduğunu göstermesi bakımından çok önemli ve değerlidir (Şekil 2.2). MODEL III-shl'den MODEL IV-shl'e geçişte tek fark flavin 8α pozisyonuna Cys397'nin kovalent olarak bağlanarak yapıya dahil edilmesidir. Bu küçük gibi görünen değişiklik aktivasyon enerjisinde PM6 yöntemi ile yapılan hesaplamalarda 4.5 kkal/mol, ONIOM(M062X/6-31+G(d,p):PM6) yöntemi ile yapılan hesaplamalarda 3.6 kkal/mol'lük önemli bir azalmaya neden olmuştur. Daha sonra MODEL V-shl'i oluşturmak üzere 7 adet daha aktif bölge amino asidi (Gly204 + Gly205 + Ileu199 + Lys296 + Val173 + Val294 + Th174) eklenmesine rağmen aktivasyon enerjisi değişmemiştir. Bu bulgular ışığında, daha büyük yapının hesaplama zamanını çok arttıracığı ve önemli bir değişiklik yapmayacağı beklenmektedir. Optimum model olarak MODEL IV yapısının kullanılması uygun görülmüştür. Böylece, kuantum kümeleme yaklaşımı ile literatürde merak konusu olan, flavin 8α pozisyonuna kovalent bağlı Cys397'nin işlevi ile ilgili önemli yeni bir bulguya da ulaşılmıştır.

3.4. MODEL IV İle MAO-A/MAO-B Serotonin/Dopamin Tepkimelerinin Kıyaslanması

MAO-A ve MAO-B enzim mekanizmaları serotonin ve dopamin olmak üzere iki farklı nörotransmitter ile çalışılmıştır. Kümeleme yaklaşımına göre seçilmiş olan MODEL IV (Şekil 2.2) yapısı yaklaşık 300 atom içeren çok büyük bir yapı olduğundan mekanizmanın yalnızca hız belirleme basamağı modellenmiştir. Farklı yöntemlerden elde edilen MODEL IV'e ait relatif Gibbs serbest enerji değerleri Tablo 3.9 ve 3.10'da verilmiştir.

Tablo 3.9. MAO-A enziminin serotonin ve dopamin nörotransmitterlerinin hidrür transferi mekanizmasına ait Gibbs serbest aktivasyon enerjisi (kcal/mol) (ΔG^\ddagger) ve ZPE düzeltilmiş enerji (ΔE^\ddagger) değerleri (kcal/mol), α C-N5 ve N11-C4a (Å) mesafeleri.

Substrat	Metot	Katman	Dondurulmuş		ΔG^\ddagger	ΔE^\ddagger	C4a-N11 (Å)	C14-N5 (Å)
			atom sayısı					
SEROTONİN	PM6	-	22		30.77	29.09	2.547 2.906	2.616 3.859
	ONIOM(M062X/ 6-31G(d):PM6)	LARGE	22		25.95	22.77	2.651 2.844	2.539 3.355
	ONIOM(M062X/ 6-31+G(d,p):PM6)	LARGE -Cys	12		24.98	22.38	2.691 3.031	3.429 2.544
	DENEYSEL	-	-		16.75	-	-	-
					16.79			
DOPAMİN	PM6	-	22		29.39	27.36	2.502 2.754	2.601 3.558
	ONIOM(M062X/ 6-31G(d):PM6)	LARGE	22		25.63	24.81	2.645 2.944	2.538 3.316
	ONIOM(M062X/6 -31+G(d,p):PM6)	LARGE -Cys	12		23.48	21.40	2.565 2.794	2.556 3.181
	DENEYSEL	-	-		17.32	-	-	-
					17.35			

Koyu renk mesafeler **TS** yapılarına, italik olanlar **RC** yapılarına aittir. Deneysel değerler (Edmondson vd., 2009) tarafından ölçülmüş k_{cat} değerleri kullanılarak dönüştürülmüştür.

Tablo 3.9 ve 3.10'da PM6 ile ONIOM sonuçları kıyaslandığında ilk göze çarpan sonuç çok daha güvenilir bir yöntem olan M062X fonksiyonelinin tüm model ve substratlarda daha düşük aktivasyon bariyeri hesaplamasıdır. Buradan, dispersiyon etkisinin PM6 yöntemine göre daha iyi temsil edildiğini görmek mümkündür.

ONIOM hesaplamaları kapsamında aktivasyon enerjisini etkileyebilecek çeşitli parametreler (temel set, yüksek seviye katmanın büyüklüğü, dondurulmuş atom sayısı) MAO-B serotonin tepkimesi üzerinde test edilmiş olup sonuçlar Tablo 3.10'da verilmiştir. Görüldüğü gibi Gibbs serbest aktivasyon enerjileri 22.23-25.30 kkal/mol aralığında değişmektedir ve bu parametrelerden az miktar etkilenmektedir. Genel olarak bakıldığında, hesaplanan bariyerler deneysel sonuçlardan 6-9 kkal/mol daha yüksektir. Bu hesaplamaların asıl amacı deneysel sonuçlar ile tam kantitatif bir uyum elde etmek değildir. Yapılan modellemelerin birçok yönü ile deney koşullarını tam olarak yansıtması zaten beklenemez. Örneğin, bizim modellemelerimizde bariyer TS ve RC enerji farkına göre hesaplanır ancak durağan konum (steady state) kinetik k_{cat} ölçümleri RC oluşması öncesindeki süreci de kapsamaktadır. Bu ve benzeri nedenlerle doğrudan kıyaslama yapmak yanıltıcı olabilir. Ayrıca deneysel değerler de birbirine çok yakındır (16.55-17.81 kkal/mol). Burada asıl amaç kalitatif bir karşılaştırma yaparak farklı mekanizmaların, farklı substratların ve iki MAO izoformunun kıyaslanmasıdır. Bu bağlamda, Tablo 3.9 ve 3.10'da kırmızı ile gösterilen ve 22 atomun dondurulduğu büyük katmanlı yapıya ait ONIOM (M06-2X/6-31G(d):PM6) sonuçlarını karşılaştırmayı tercih ettik çünkü dondurulan atom sayılarının daha az olduğu bazı yapıların gerçek kristal yapı koordinatlarından sapma riski taşıdıkları gözlenmiştir.

MAO-B için, iki nörotransmitter (serotonin/dopamin) karşılaştırıldığında hesaplanan aktivasyon enerjilerinde farklılık göze çarpmaktadır. PM6 yöntemi ile yapılan hesaplamalarda serotonin için daha düşük bir bariyer bulunmuştur (serotonin için 25.1 kkal/mol, dopamin için 27.3 kkal/mol) ancak, bu fark PM6 yönteminin hata payı içindedir. ONIOM (M06-2X/6-31G(d):PM6) yöntemi dopamin için daha düşük bir bariyer (dopamin için 22.5 kkal/mol serotonin için 24.1 kkal/mol) tahmin etmiştir ki bu sonuç deneysel bulgularla uyum içindedir. Aynı yöntem, PC yapısındaki α C-N5 mesafesini dopamine kıyasla serotonin için az miktar daha kısa tahmin etmektedir. PC yapısında TYR435 amino asidinin -OH grubu serotonin benzen halkasının π elektronları ile güçlü bir etkileşim içinde olduğu ve aynı zamanda TYR398 -OH grubu ile serotoninin -OH fonksiyonel grubunun kuvvetli bir H-bağı yaptığı görülmüştür. Söz konusu etkileşimlerin serotoninin flavin yapısına daha yakın kalmasını sağladığı anlaşılmıştır.

MAO-A enziminde deneysel olarak dopamin aktivasyon bariyeri ortamına bağlı olarak 17.32 kkal/mol, ve 17.35 kkal/mol, serotonin için ise aktivasyon bariyeri 16.75 kkal/mol, 16.79 kkal/mol olarak bulunmuştur (Edmondson vd., 2009) ve serotonin az miktar daha hızlı oksitlenmektedir. Ancak ONIOM (M06-2X/6-31G(d):PM6) yöntemi ile dopamin ve serotonin

için hesaplanan Gibbs aktivasyon bariyerleri hemen hemen aynıdır. Aktivasyon enerjisi ΔE^\ddagger olarak karşılaştırıldığında ise beklenildiği gibi MAO-A'nın serotonini daha hızlı katalizlediği görülmektedir.

Tablo 3.10. MAO-B enziminin serotonin ve dopamin nörotransmitterlerinin hidrür transferi mekanizmasına ait Gibbs serbest aktivasyon enerjisi (kcal/mol) (ΔG^\ddagger) ve ZPE düzeltilmiş enerji (ΔE^\ddagger) değerleri (kcal/mol), α C-N5 ve N11-C4a (Å) mesafeleri.

Substrat	Metot	Katman	Dondurulmuş atom sayısı	ΔG^\ddagger	ΔE^\ddagger	C4a-N11 (Å)	C14-N5 (Å)	
SEROTONİN	PM6	-	22	25.12	23.66	2.604 3.029	2.595 3.113	
	ONIOM(M062X/6 -31+G(d,p):PM6	SMALL	22	22.52	22.39	2.627 2.78	2.551 3.278	
	ONIOM(M062X/6 -31G(d):PM6	LARGE	22	24.11	22.96	2.542 2.658	2.555 3.24	
	ONIOM(M062X/6 -31G(d):PM6	LARGE	12	23.29	23.38	2.538 2.676	2.243 3.292	
	ONIOM(M062X/6 -31+G(d,p):PM6	LARGE	22	22.97	22.48	2.562 2.73	2.552 3.231	
	ONIOM(M062X/6 -31+G(d,p):PM6	LARGE	11	25.30	25.39	2.556 2.745	2.556 3.29	
	ONIOM(M062X/6 -31+G(d,p):PM6	LARGE -Cys	12	22.23	23.82	2.539 2.741	2.557 3.303	
	DENEYSEL	-	-	17.44 17.81	-	-	-	
	DOPAMİN	PM6	-	22	27.27	26.28	2.430 2.688	2.609 3.436
		ONIOM(M062X/6 -31G(d):PM6	LARGE	22	22.48	21.94	2.570 2.705	2.567 3.296
ONIOM(M062X/6 -31+G(d,p):PM6		LARGE -Cys	12	25.68	27.79	2.558 2.773	2.560 3.308	
DENEYSEL		-	-	16.55 17.41	-	-	-	

Koyu renk mesafeler **TS** yapılarına, italik olanlar **RC** yapılarına aittir. Deneysel değerler (Edmondson vd., 2009) tarafından ölçülmüş k_{cat} değerleri kullanılarak dönüştürülmüştür.

4. GENEL DEĞERLENDİRME VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında monoamin oksidaz enzimleri ile substratları arasında gerçekleşen oksidasyon reaksiyonunun tek basamaklı mı yoksa çok basamaklı bir mekanizma mı olduğu araştırılmıştır. Çok basamaklı modifiye hidrür transferi mekanizması MAO enzimi için belirlenen uygun aktif bölge yapısında modellenmiştir. Gerçekleştirilen bu çalışmalar ve sonucunda elde edilen bulgular özetlenecek olursa:

1. MODEL IIa ve serotonin kullanılarak yapılan ONIOM(M062X/6-31+G(d,p):PM6 hesaplamaları ile mekanizmanın tüm basamakları modellenmiştir. Literatürde küçük aktif bölge modelinde doğrudan oluştuğu öne sürülen N5-ADD araürününün aslında bir N5 yilidi (N5_{yl}) olduğu ve enzim katalizlemesini geri döndürdüğü tespit edilmiştir. Enzim aktif bölgesindeki amino asitler ve su molekülleri yeteri miktarda modellemelere katıldığında doğrudan iminyum katyonu içeren PC_{inv} oluşmaktadır. PC_{inv} ile N5_{yl} arasındaki dinamik denge mekanizma bazlı kovalent-geri dönüşümlü bir inhibisyona neden olur. Bu durumun mantıklı izahı şudur: Serotonin gibi iyi substrat için PC_{inv} yapısı N5_{yl} araürününden daha karardır ve bu nedenle geri reaksiyon aktivasyon bariyeri de daha düşüktür. Bunun aksine mekanizma bazlı güçlü bir inhibitörde N5_{yl} araürünü daha karardır, geri reaksiyon aktivasyon bariyerinin daha yüksek olması beklenir. Başka bir deyişle enzim inhibisyonunun nedeni N5_{yl} araürününden karardır. Çünkü ne kadar karardır bir yilid oluşursa bu dengenin geri dönme hızı o kadar yavaşlayacaktır ve bu süre boyunca enzimin aktivitesi duracaktır. Geri dönüşümlü inhibitörler genellikle enzimlerle kovalent bağ yapmadan fiziksel etkileşimler ile bağlanırlar ve yan etkileri daha az olduğundan tercih edilirler. Ancak böyle inhibitörlerin etkinlikleri kovalent bağlanan inhibitörlere göre daha azdır. Kovalent bağlanan inhibitörler ise etkinliği çok yüksek olmalarına rağmen genellikle enzim aktivitesini geri dönüşümsüz bir şekilde durdurduklarından çok ciddi yan etkiler gösterirler. Bu bağlamda, enzimi kovalent bağ yaparak geri dönüşümlü olarak inhibe eden bileşiklerin keşfedilmesinin çok önemli olduğunu düşünüyoruz. Tez çalışmasının bu bölümünde modellenen mekanizmanın yeni kovalent-geri dönüşümlü ilaçların tasarımı için kullanılabileceğini öneriyoruz.
2. Flavoenzimlerin sadece %10'unun flavin kofaktörüne kovalent bağlı olmasından dolayı MAO'daki kovalent flavinin işlevi de merak konusudur (Starbird vd., 2015). Bu konu MODEL IIa ve MODEL IV yapıları üzerinden araştırılmıştır. Söz konusu modellerin kovalent bağısız FAD içeren mutant tipleri oluşturularak karşılaştırılmıştır. Kovalent

bağımsız mutant tipinde aktivasyon enerjisi yaklaşık 1.9 kkal/mol artmış olup hızın 22 kat azalacağı sonucunu ortaya koymuştur.

3. MAO mekanizmasının modellenmesi için optimum aktif bölge büyüklüğü kuantum kümeleme yaklaşımı ile tespit edilmiştir. Buna göre, substrat, FAD, Tyr398, Tyr435, Tyr188, Phe343, Tyr326, Cys172, Leu171, Ileu198, Glu206, Tyr60, Cys397, 8 H₂O kapsayan ve yaklaşık 300 atom bulunduran MODEL IV uygun bulunmuştur. Çok yeni bir başka teorik çalışmada (Zapata vd., 2015) MAO-B enzimindeki Lys296 amino asidinin ve N5 ile arasında bulunan H₂O molekülü ile yaptığı hidrojen bağlarının mekanizmayı etkileyebileceği önerilmiştir. Fakat bizim çalışmamızda Lys296 ile birlikte yapıya 7 adet daha amino asit (Lys296 + Gly204 + Gly205 + Ileu199 + Val173 + Val294 + Thr174) MODEL IV yapısına katılmasına rağmen MODEL V için aktivasyon enerjisi çok az bir miktar etkilenmiştir.
4. Kuantum kümeleme yaklaşımı ile elde edilen en optimum aktif bölge yapısı (MODEL IV) kullanılarak serotonin/dopamin oksidasyonu MAO-A ve MAO-B için ayrı ayrı modellenmiştir. ONIOM (M06-2X/6-31G(d):PM6) yöntemi ile yapılan optimizasyonlardan elde edilen sonuçlara göre hesaplanan bariyerler kalitatif olarak deneysel bulgularla örtüşmektedir.
5. Tez çalışması kapsamında cevabı araştırılan sorulardan biri de mekanizmanın proton transferi mi yoksa hidrür transferi mi olduğudur. Direk hidrür transferi mekanizmasında α C- α H bağ kırılması tek basamakta gerçekleşir. Abad vd. (2013) tarafından yakın zamanda proton transferi mekanizmasının da eşzamansız tek adımlı bir şekilde olabileceği önerilmiştir. Tek basamaklı bir mekanizmada amin azotu üzerindeki eşleşmemiş elektron çiftinin Flavin C4a'dan N5 atomuna doğru (polar nükleofilik/proton transferi) saat yönünde mi yoksa α C üzerinden N5'e (hidrür transferi) saat yönünün tersinde mi hareket ettiğini anlamak oldukça güçtür. Proton transferinde Flavin N5 üzerindeki elektron yoğunluğu birikimi nükleofilik karakteri artırır ve böylece pro-R α H proton olarak aktarılır. Bu durumda α proton ve aminin eşleşmemiş elektron çifti birbirinden ayrı olarak taşınır ve eşleşmemiş elektron çiftinin hareket yönü ile α H'nin hareketi birbirlerine terstir. Hidrür transferinde ise α C-H bağ ayrılması ile α C'da elektron birikir ve böylece kırılan bağın elektronları ile α H Flavin N5 atomuna transfer olur. Böylelikle elektron çifti ve proton aynı yönde hareket etmiş olur. Tez kapsamında MODEL IIa ile incelenen NBO donör-akseptör etkileşimleri her iki mekanizmanın birlikte olabileceği hibrit bir mekanizmayı işaret etmiştir.

KAYNAKLAR

- Akyüz, M. A., Erdem, S. S., Edmondson, D. E., (2007). Aromatic Cage in the Active Site of Monoamine Oxidase B: Effect on the Structural and Electronic Properties of Bound Benzylamine and p-Nitrobenzylamine, *Journal of Neural Transmission*, 114, 693-698.
- Akyüz, M. A., Erdem, S. S., (2013). Computational modeling of the direct hydride transfer mechanism for the MAO catalyzed oxidation of phenethylamine and benzylamine: ONIOM (QM/QM) calculations. *J. Neural Transm.*, 120, 937-945.
- Abad, E., Zenn, R. K., Kastner, J., (2013). Reaction Mechanism of Monoamine Oxidase from QM/MM Calculations. *J. Phys. Chem. B.*, 117(46), 14238-14246.
- Barf, T., Kaptein, A., (2012). Irreversible protein kinase inhibitors: balancing the benefits and risks. *J. Med. Chem.*, 55, 6243–6262
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L., (2002). *Biochemistry*, 5th Edition, International Edition, New York, USA.
- Binda, C., Newton-Vinson, P., Hubálek, F., Li, M., Edmondson, D. E., Mattevi, A., (2002). Structure of Human Monoamine Oxidase B, a Drug Target for the Treatment of Neurological Disorders. *Nat. Struct. Biol.*, 9, 22-26.
- Blow, D. M., Birktoft, J., Hartley, B. S., (1969). Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. *Nature*, 221, 337–340.
- Bonivento, D., Mattevi, A. (2008). Structural and Mechanistic Studies of Mofegiline Inhibition of Human Recombinant Monoamine Oxidase B. *J. Med. Chem.*, 51, 8019-8026
- Bonivento, D., Milczek, E. M., McDonald, G. R., Binda, C., Holt, A., Edmondson, D. E., Mattevi, A., (2010). Potentiation of Ligand Binding Through Cooperative Effects in Monoamine Oxidase B. *J. Biol. Chem.*, 285, 36849-368556.
- Browne, T. R., Mattson, R. H., Penry, J. K., Smith, D. B., Wilder, B.J., Treiman, D. M., Ben-Menachem, E., Miketta, R. M., Sherry, K. M., Szabo, G. K., (1989). A multicenter study of vigabatrin for drug resistant epilepsy. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 27(1), 95–100.
- Can, O. (2007) Para-süstitüe benzilaminlerin monoamin oksidaz ile tepkimelerinde yapı-aktiflik ilişkisinin incelenmesi. Yüksek lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.

- Carter, P., Wells, J. A., (1988). Dissecting the catalytic triad of a serine protease. *Nature*, 332, 564–568.
- Chajkowski-Scarry, S., Rimoldi, J. M., (2014). Monoamine oxidase A and B substrates: probing the pathway for drug development. *Future Med. Chem.*, 6(6), 697–717.
- Chlumsky, L. J., Sturgess, A. W. Nieves, E., Jorns, M. S., (1998). Identification of the covalent flavin attachment site in sarcosine oxidase. *Biochemistry*, 37, 2089–2095.
- Chiba, K., Trevor, A., Castagnoli, N., (1984). Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 120, 574–578.
- Chung, L.W., Sameera, W. M. C., Ramozzi, R., Page, A.J., Hatanaka, M., Petrova, G.P., Harris, T.V., Li, X., Ke, Z., Liu, F., Li, H., Ding, L., Morokuma, K., (2015). The ONIOM Method and Its Applications. *American Chemical Society*, 115, 5678–5796.
- Colibus, L. D., Li, M., Binda, C., Lusting, A., Edmondson D. E., Mattevi, A., (2005). Three-Dimensional Structure of Human Monoamine Oxidase A (MAO-A): Relation to the Structures of Rat MAO and Human MAO-B. *PNAS*, 102, 12684-12689.
- Covitz, T., Westheimer, F. H., (1963). The hydrolysis of methyl ethylene phosphate: steric hindrance in general base catalysis. *J. Am. Chem.Soc.*, 85, 1773–1777.
- Daprigh, S., Komaromi, I., Byun, K. S., Morokuma, K., Frisch, M. J., (1999). A New ONIOM Implementation in Gaussian98. Part I. The Calculation of Energies, Vibrational Frequencies and Field Derivatives. *Journal of Molecular Structure Theochem*, 461-462, 1-21.
- Dixon, D. A., Dunning, J.T.H., Eades, J.R.A., Gasman, P.G., (1983). Generalized Valence Bond Description of Simple Ylides. *J. Am. Chem. SOC.*, 105(24), 7011-7017.
- Doukyu, N., (2009). Characteristics and biotechnological applications of microbial cholesterol oxidases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 83, 825–837
- Edmondson, D.E., Bhattacharyya, A.K., Walker, M.C., (1993) Spectral and kinetic studies of imine product formation in the oxidation of p-(N,N-dimethylamino)-benzylamine analogues by monoamine oxidase B. *Biochemistry*, 32, 5196–5202.

- Edmondson, D. E., Mattevi, A., Binda, C., Li, M., Hubalek, F., (2004). Structure and Mechanism of Monoamine Oxidase. *Current Medicinal Chemistry*, 11, 1983- 1993.
- Edmondson, D. E., Binda, C., Mattevi, A. (2007). Structural insights into the mechanism of amine oxidation by monoamine oxidases A and B. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 464, 269-276.
- Edmondson, D.E., Binda, C., Wang, J., Upadhyay, A.K., Mattevi, A., (2009). Molecular and Mechanistic Properties of the Membrane-Bound Mitochondrial Monoamine Oxidases. *Biochemistry*, 48(20), 4220–4230.
- Engin, H., Çakır, K., Atalay, V. E., Erdem, S. S., (2014). Monoamin Oksidaz Enziminin Nörotransmitter Aminleri Oksitleme Mekanizmasına Elektron-çekici Grupların Etkisinin İncelenmesi, 1.Ulusal Hesaplamalı Kimya Çalıştayı, 29-31 Mayıs 2014, Van, Türkiye.
- Engin, H., (2015). Monoamin Oksidaz B (Mao B) Katalizleme Tepkimesine Aktif Bölgenin Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye
- Erdem, S. S., Karahan, Ö., Yıldız, İ., Yelekçi, K., (2006). A Computational Study on the Amine-Oxidation Mechanism of Monoamine Oxidase: Insight to the Polar Nucleophilic Mechanism. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 4, 646-658.
- Erdem, S. S., Büyükmenekşe, B., (2011). Computational investigation on the structure-activity relationship of the biradical mechanism for monoamine oxidase. *J. Neural. Transm.*, 118, 1021-1029.
- Erdem, S. S., Özpınar, G. A., Boz, Ü., (2014). Quantum chemical modelling of the inhibition mechanism of monoamine oxidase by oxazolidinone and analogous heterocyclic compounds. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 29, 81-86
- Fitzpatrick, P. F., (2004). Carbanion versus Hydride Transfer Mechanisms in Flavoprotein-Catalyzed Dehydrogenations. *Bioorganic Chem.*, 32, 125-139.
- Fitzpatrick, P. F., (2010). Oxidation of amines by flavoproteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 493, 13–25.
- Foster, J. P., Weinhold, F., (1980). Natural hybrid orbitals. *J. Am. Chem. Soc.*, 102 (24), 7211–7218.

- Fowler, C.J., Benedetti, M.S., (1983). The Metabolism of Dopamine by Both Forms of Monoamine Oxidase in the Rat Brain and Its Inhibition by Cimoxatone. *J. Neurochem.*, 40, 1534–1541.
- Fukui, K., (1981). The path of chemical-reactions – the IRC approach. *Acc. Chem. Res.*, 14, 363–368.
- Gangadharana, R.P., Krishnanb, S.S., (2014). Natural Bond Orbital (NBO) Population Analysis of 1-Azanaphthalene-8-ol. *ACTA PHYSICA POLONICA A*, 125(1), 18-22
- Gaweska, H., Fitzpatrick, F. P., (2011). Structures and Mechanism of the Monoamine Oxidase Family. *Biomol Concepts.*, 2(5), 365–377.
- Georgieva, P., Himo F., (2010). Quantum Chemical Modeling of Enzymatic Reactions: The Case of Histone Lysine Methyltransferase, *J. Comput. Chem.*, 31, 1707–1714.
- Gram, L., Larsson, O. M., Johnsen, A., Schoesboe, A., (1989). Experimental studies of the influence of vigabatrin on the GABA system. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 27(1), 13–17.
- Heuts, D.P.H.M., Scrutton, N.S., McIntire, W.S., Fraaije, M.W., (2009). What’s in a covalent bond? On the role and formation of covalently bound flavin cofactors. *FEBS Journal*, 276, 3405–3427
- Hiro, I., Tsugeno, Y., Hirashiki, I., Ogata, F., and Ito, A., (1996). Characterization of Rat Monoamine Oxidase A with Noncovalently-Bound FAD Expressed in Yeast Cells, *J. Biochem.*, 120, 759–765.
- Honig, B., Karplus, M., (1971). Implications of torsional potential of retinal isomers for visual excitation. *Nature*, 229(5286), 558–560.
- Hopkins, S.C., Heffernan, M. L. R., Saraswat, L. D., Bowen, C. A., Melnick, L., Hardy, L.W., Orsini, M.A., Allen, M.S., Koch, P., Spear, K.L., Foglesong, R.J., Soukri, M., Chytil, M., Fang, Q. K., Jones, S.W., Varney, M.A., Panatier, A., Oliet, S.H.R., Pollegioni, L., Piubelli, L., Molla, G., Nardini, M., Large, T.H., (2013) Structural, Kinetic, and Pharmacodynamic Mechanisms of D- Amino Acid Oxidase Inhibition by Small Molecules. *J. Med. Chem.*, 56, 3710–372

- Hubálek, F., Binda, C., Li, M., Herzig, Y., Sterling, J., Youdim, M.B.H., Mattevi, A., Edmondson, D.E., (2004). Inactivation of purified human recombinant monoamine oxidase A and B by rasagiline and its analogues. *J. Med. Chem.*, 47, 1760–1766.
- Hubálek, F., Binda, C., Khalil, A., Li, M., Mattevi, A., Castagnoli, N., Edmondson, D.E., (2005). Demonstration of isoleucine 199 as a structural determinant for the selective inhibition of human monoamine oxidase B by specific reversible inhibitors. *J. Biol. Chem.*, 280, 15761–15766.
- Kalgutkar, A. S., Dalvie, D. K., Castagnoli, N., Taylor, T. J., (2001). Interactions of nitrogen-containing xenobiotics with monoamine oxidase (MAO) isozymes A and B: SAR studies on MAO substrates and inhibitors. *Chem. Res. Toxicol.*, 14, 1139–1162.
- Karadakov, P. B., Morokuma, K., (2000). ONIOM as an Efficient Tool for Calculating NMR Chemical Shielding Constants in Large Molecules. *Chemical Physics Letters*, 317, 589–596.
- Karasulu, B., Patil, M., Thiel, W., (2013). Amine Oxidation Mediated by Lysine-Specific Demethylase 1: Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Insights into Mechanism and Role of Lysine 661. *J. Am. Chem. Soc.*, 135(36), 13400–13413.
- Karasulu, B., Thiel, W., (2015). Amine Oxidation Mediated by N-Methyltryptophan Oxidase: Computational Insights into the Mechanism, Role of Active-Site Residues, and Covalent Flavin Binding. *ACS Catal.*, 5(2), 1227–1239.
- Kay, C. W. M., Mkami, H. E., Molla, G., Pollegioni, L., Ramsay, R. R., (2007). Characterization of the Covalently Bound Anionic Flavin Radical in Monoamine Oxidase A by Electron Paramagnetic Resonance. *J. AM. CHEM. SOC.*, 129, 16091-16097.
- Kearney, E. B., Salach, J. I., Walker, W. H., Seng, R. L., Kenney, W., Zeszotek, E., Singer, T. P., (1971). Covalently-bound flavin of hepatic monoamine oxidase. I. Isolation and sequence of a flavin peptide and evidence for binding at the 8 α position. *Eur. J. Biochem.*, 24, 321.
- Kerdcharoen, T., Morokuma, K., (2003). Combined quantum mechanics and molecular mechanics simulation of Ca²⁺/ammoniaCa²⁺/ammonia solution based on the ONIOM-XS method: Octahedral coordination and implication to biology. *J. Chem. Phys.*, 118, 8856.

- Kong, X., Ouyang, S., Liang, Z., Lu, J., Chen, L., Shen, B., Li, D., Zheng, M., Li, K.K., Luo, C., Jiang, H., (2011). Catalytic Mechanism Investigation of Lysine-Specific Demethylase 1 (LSD1): A Computational Study. *PlosOne*, 6(9), 1-11.
- Koshland, D. E., (1958) Jr. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 44, 98–105.
- Li, M., Binda, C., Mattevi, A., Edmondson, D. E., (2006). Functional role of the "aromatic cage" in human monoamine oxidase B: structures and catalytic properties of Tyr435 mutant proteins. *Biochemistry*, 45, 4775-4784.
- Liao, R. Z., Yu, J. G., Himo, F., (2011). Quantum Chemical Modeling of Enzymatic Reactions: The Case of Decarboxylation. *J. Chem. Theory Comput.*, 7, 1494–1501.
- Lightstone, F. C., Bruice, T. C., (1996). Ground state conformations and entropic and enthalpic factors in the efficiency of intramolecular and enzymic reactions. 1. Cyclic anhydride formation by substituted glutarates, succinate, and 3,6-Endoxo- Δ 4-tetrahydrophthalate monophenyl esters. *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 2595–2605.
- Lu, X., Rodrigez, M., Silverman, R. B., Vintem A. P. B., Ramsay, R. R., (2002). Irreversible inactivation of mitochondrial monoamine oxidase. *Flavins and flavoproteins*, Agency for Scientific Publications, Vienna, Avusturya.
- Ma, J., Yoshimura, M., Yamashita, E., Nakagawa, A., Ito A., Tsukihara T., (2004). Structure of rat monoamine oxidase A and its specific recognitions for substrates and inhibitors. *J. Mol. Biol.*, 338, 103–114.
- Mack, M., Grill, S., (2006). Riboflavin analogs and inhibitors of riboflavin biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol*, 71, 265–275
- Mah, R., Thomas J.R., Shafer, C.M., (2014). Drug discovery considerations in the development of covalent inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(1), 33-39.
- Marianski, M., Dannenberg, J. J., (2012). Aqueous Solvation of Polyalanine α -Helices with Specific Water Molecules and with the CPCM and SM5.2 Aqueous Continuum Models Using Density Functional Theory. *J. Phys. Chem. B*, 116(4), 1437–1445

- Miller, J. R., Edmondson, D. E., (1999). Structure-activity relationships in the oxidation of para-substituted benzylamine analogues by recombinant human liver monoamine oxidase A. *Biochemistry*, 38, 13670–13683.
- Messenheimer, J. A., (1994). Lamotrigine. *Clin. Neuropharmacol.*, 17, 548–559.
- Messenheimer, J., Ramsey, R. E., Willmore, L.J., (1994). Lamotrigine therapy for partial seizures: a multicenter, placebo - controlled, double - blind, cross - over trial. *Epilepsia*, 35, 113 – 121.
- Nagy, J., Salach, J. I., (1981). Identity of active site flavin peptide fragments from the human “A” form and the bovine “B” form of monoamine oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 208, 388–394.
- Nandigama, R.K., Edmondson, D.E., (2000) Influence of FAD structure on its binding and activity with the C406A mutant of recombinant human liver monoamine oxidase A. *J Biol Chem* 275, 20527–20532.
- Nandigama, R.K., Miller, J.R., Edmondson, D.E., (2001). Loss of serotonin oxidation as a component of the altered substrate specificity in the Y444F mutant of recombinant human liver MAO A. *Biochemistry*, 40(49),14839-14846.
- Naito, T., Nagase, S., Yamataka, H., (1994). Theoretical Study of the Structure and Reactivity of Ylides of N, P, As, Sb, and Bi. *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 10080-10088.
- Nelson, D. L., Cox, M. M., (2012) *Lehninger Principles of Biochemistry*, 6th Edition., North American Edition, New York, USA.
- Orru, R., Aldeco, M., Edmondson, D. E., (2013). Do MAO A and MAO B utilize the same mechanism for the C–H bond cleavage step in catalysis? Evidence suggesting differing mechanisms. *J. Neural Transm.*, 120, 847-851.
- Ozimek, P., Veenhuis, M., Klei, I. J., (2005). Alcohol oxidase: A complex peroxisomal, oligomeric flavoprotein. *FEMS Yeast Research*, 5,975–983
- Ralph, E. C., Hirschi, J. S., Anderson, M. A., Cleland, W. W., Singleton, D. A., Fitzpatrick, P. F., (2007). Insights into the Mechanism of Flavoprotein-Catalyzed Amine Oxidation from Nitrogen Isotope Effects on the Reaction of

N-Methyltryptophan Oxidase. *Biochemistry*, 46, 7655-7664.

Re, S., Morokuma, K., (2004). Own N-layered integrated molecular orbital and molecular mechanics study of the reaction of OH⁻ with polychlorinated hydrocarbons CH₂(4-n)Cl_n (n=2–4). *Theor. Chem. Acc.*, 112, 59-67.

Pandey, G., Banerjee, P., Gadre, S. R., (2006). Construction of Enantiopure Pyrrolidine Ring System via Asymmetric [3+2]-Cycloaddition of Azomethine Ylides. *Chem. Rev.*, 106, 4484-4517.

Rebrin, I., Geha, R.M., Chen, K., Shih, J.C., (2001) Effects of Carboxyl-terminal Truncations on the Activity and Solubility of Human Monoamine Oxidase B. *J. Biol. Chem.*, 276, 29499–29506.

Reed, A. E., Curtiss, L. A., Weinhold, F., (1988). Intermolecular interactions from a natural bond orbital, donor-acceptor viewpoint. *Chem. Rev.*, 88, 899-926.

Repič, M., Purg, M., Vianello, R., Mavri, J., (2014a). Examining Electrostatic Preorganization in Monoamine Oxidases A and B by Structural Comparison and pK_a Calculations. *J. Phys. Chem B*, 118, 4326–4332.

Repič, M., Vianello, R., Purg, M., Duarte, F., Bauer, P., Kamerlin, S.C.L., Mavri, J., (2014b). Empirical valence bond simulations of the hydride transfer step in the monoamine oxidase B catalyzed metabolism of dopamine. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 82, 3347–3355.

Riederer, P., Przuntek, H., (1987). In MAO-B Inhibitor Selegiline (R-Deprenyl). Springer-Verlag, Wein, Germany.

Rinne, U. K., (1978). Recent advances in research on Parkinsonism. *Acta Neurol Scand Suppl.*, 67, 77.

Sablin, S.O., Ramsay, R.R., (2001). Substrates but not inhibitors alter the redox potentials of monoamine oxidases. *Antioxid. Redox Signal.*, 3, 723–729.

Siegbahn, P. E.M., Himo, F., (2011). The quantum chemical cluster approach for modeling enzyme reactions, *Computational Molecular Science*, 1, 323–336.

- Silverman, R. B., (1992). Electron Transfer Chemistry of Monoamine Oxidase Advances In Electron Transfer Chemistry, 2, JAI Press, Bingley, UK.
- Silverman, R. B., Ding, C. Z., (1993). Chemical-model for a mechanism of inactivation of monoamine-oxidase by heterocyclic-compounds – electronic effects on acetal hydrolysis. *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 4571–4576.
- Silverman, R. B., Ding C. Z., Gates K. S., (1993). Design and Mechanism of Monoamine Oxidase Inactivators from an Organic Chemical Perspective *Perspectives in Medicinal Chemistry*, Verlag Helvetica Chimica Acta, Basel, İsviçre.
- Silverman, R. B., (1995). Radical Ideas about Monoamine Oxidase. *Acc. Chem. Res.*, 28, 335-342.
- Silverman, R. B., Holladay, M. W., (2014) *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, 3rd Edition., Elsevier Academic Press, San Diego, USA.
- Singh, J., Petter, R.C., Baillie, T.A., Whitty, A., (2011). The resurgence of covalent drugs. *Nature Reviews*, 10, 307-317
- Son, S. Y., Ma, J., Kondou, Y., Yoshimura, M., Yamashita, E., Tsukihara, T., (2008). Structure of human monoamine oxidase A at 2.2-Å resolution: The control of opening the entry for substrates/inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 105, 5739-5744.
- Stewart, J. J. P., (2008). Application of the PM6 method to modeling the solid state. *J. Mol. Model.*, 14, 499–535.
- Stewart, J. J. P., (2009). Application of the PM6 method to modeling proteins. *J. Mol. Model.*, 15, 765–805.
- Sucharitakul, J., Wongnate, T., Chaiyen, P., (2010). Kinetic Isotope Effects on the Noncovalent Flavin Mutant Protein of Pyranose 2-Oxidase Reveal Insights into the Flavin Reduction Mechanism. *Biochemistry*, 49, 3753–3765
- Suresh, C.H., Koga, N., (2002). Quantifying the Electronic Effect of Substituted Phosphine Ligands via Molecular Electrostatic Potential. *Inorg. Chem*, 41 (6), 1573–1578.
- Truhlar, D. G., Zhao, Y., (2006). The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and

- transition elements: two new functionals and systematic testing of four-MO6 class functionals and 12-other functionals. *Theor Chem Account*, 120, 215-24.
- Upadhyay, A.K., Borbat, P.P., Wang, J., Freed, J.H., Edmondson, D.E., (2008). Determination of the Oligomeric States of Human and Rat Monoamine Oxidases in the Outer Mitochondrial Membrane and Octyl β -d-Glucopyranoside Micelles Using Pulsed Dipolar Electron Spin Resonance Spectroscopy. *Biochemistry*, 47,1554–1566.
- Vianello, R., Repič, M., Mavri, J., (2012). How are biogenic amines metabolized by monoamine oxidases?. *Eur. J. Org. Chem.*, 36, 7057-7065.
- Walker M.C., Edmondson, D.E., (1994) Structure-activity relationships in the oxidation of benzylamine analogues by bovine liver mitochondrial monoamine oxidase B. *Biochemistry*, 33, 7088–7098.
- Weinreb, O., Amit, T., Riederer, P., Youdim, M. B. H., Mandel, S. A., (2011). Neuroprotective profile of the multitarget drug rasagiline in Parkinson's disease. *Int. Rev. Neurobiol.*, 100, 127–149.
- Woo, J. C. G., Silverman, R. B., (1995). Monoamine oxidase B catalysis in low aqueous medium. Direct evidence for an imine product. *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 1663-1664.
- Wu, H., Chen, K., Shih, J. C., (1993). Site-directed mutagenesis of monoamine oxidase A and B: role of cysteines. *Mol. Pharmacol.*, 43, 888–893.
- Wu, J., Albrecht, L., Boyd, R.J., (2011). Effect of counterions on the protonation state in a poly(G)-poly(C) radical cation. *J Phys Chem B.*,115(49), 14885-14890.
- Youdim, M.B.H., Edmondson D.E., Tipton, K.F., (2006). The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nat. Rev. Neurosci.*, 7, 295–309.
- Zapata, T. G., Fierro, A., Barriga, G. G., Salgado, J. C., Celis, B. C., (2015). Revealing Monoamine Oxidase B Catalytic Mechanisms by Means of the Quantum Chemical Cluster Approach. *J. Chem. Inf. Model.*, 55, 1349–1360.
- Zenn, R. K., Abad, E., Kastner, J., (2015). Influence of the Environment on the Oxidative Deamination of p-Substituted Benzylamines in Monoamine Oxidase. *J. Phys. Chem. B*, 119(9), 3678-3696.



EKLER

Tablo S1. ONIOM (M062x/6-31+G(d,p):PM6) metodu ile hesaplanmış önemli dihedral açılar, C14-H15-N5 açısı ve N11-C4a mesafesi.

(a) Kovalent bağlı MODEL IIa-shl sonuçları.

	RC	TS	PC _{inv}	TS _{N5-PC}	N5 _{yl}	TS _{H2O}	PC
$\theta(\text{C9-C8-C7-C6})$	10.06	8.36	6.06	9.09	7.75	9.53	6.32
$\theta(\text{C9-C9a-C5a-C6})$	8.59	7.70	6.90	8.85	6.46	12.54	8.22
$\theta(\text{N10-C9a-C5a-N5})$	6.37	4.95	3.57	2.30	1.05	12.39	5.61
$\theta(\text{N10-C10a-C4a-N5})$	2.24	6.94	9.86	18.76	19.03	4.37	5.98
$\theta(\text{N1-C10a-C4a-C4})$	2.29	4.91	-0.96	9.03	8.46	3.56	-9.90
$\theta(\text{N1-C2-N3-C4})$	7.54	4.96	4.03	12.25	11.22	2.48	6.73
$\theta(\text{N1-C10a-C4a-N5})$	-176.90	-173.00	-167.45	-161.49	-161.51	-172.87	-175.01
$\theta(\text{N10-C10a-C4a-C4})$	-178.56	-175.15	176.35	-170.72	-171.01	-179.20	171.09
$\theta(\text{C9a-N10-C10a-C4a})$	-2.06	-10.70	-19.87	-28.61	-32.25	5.78	-20.64
$\theta(\text{C10a-C4a-N5-C5a})$	2.03	3.41	7.20	3.22	6.55	-5.87	14.39
$\theta(\text{C6-C5a-N5-C4a})$	178.09	-175.32	-169.36	-167.13	-161.70	167.20	-167.69
$\theta(\text{C5a-N5-C4a-C4})$	178.75	171.36	173.69	160.98	157.78	-170.62	174.33
$\theta(\text{C14-H15-N5})$		152.13					
R(N11-C4a)	2.73	2.59	3.00	2.90	2.86	3.51	3.09

(b) Kovalent bağımsız MODEL IIa-shl sonuçları.

	RC	TS	PC _{inv}	TS _{N5-PC}	N5 _{yl}
$\theta(\text{C9-C8-C7-C6})$	3.75	2.91	2.31	2.40	2.26
$\theta(\text{C9-C9a-C5a-C6})$	3.68	3.67	3.31	2.84	2.17
$\theta(\text{N10-C9a-C5a-N5})$	2.09	1.03	-2.42	-4.74	-5.16
$\theta(\text{N10-C10a-C4a-N5})$	2.45	5.69	9.12	17.63	19.32
$\theta(\text{N1-C10a-C4a-C4})$	-0.68	1.07	2.95	8.38	11.32
$\theta(\text{N1-C2-N3-C4})$	10.52	4.70	5.93	11.56	13.55
$\theta(\text{N1-C10a-C4a-N5})$	-174.90	-174.91	-169.69	-162.49	-161.58
$\theta(\text{N10-C10a-C4a-C4})$	-178.34	-178.34	-178.24	-171.51	-167.78
$\theta(\text{C9a-N10-C10a-C4a})$	-2.33	-2.33	-7.66	-26.76	-29.69
$\theta(\text{C10a-C4a-N5-C5a})$	-5.42	-5.42	-6.98	-0.41	0.39
$\theta(\text{C6-C5a-N5-C4a})$	176.38	-176.69	-179.10	-167.21	-164.42
$\theta(\text{C5a-N5-C4a-C4})$	-178.29	-178.30	-179.79	162.48	157.51
$\theta(\text{C14-H15-N5})$		149.68			
R(N11-C4a)	2.79	2.61	3.04	2.91	2.92

(c) Kovalent bağı-bağısız MODEL IV-shl sonuçları.

	MODEL IVcFAD-shl				MODEL IVnFAD-shl			
	RC	TS	PC _{inv}	N5 _{yl}	RC	TS	PC _{inv}	N5 _{yl}
$\theta(\text{C9-C8-C7-C6})$	9.49	6.67	5.39	5.28	6.44	4.13	0.80	2.56
$\theta(\text{C9-C9a-C5a-C6})$	8.56	6.67	4.78	4.81	6.30	4.64	1.68	2.00
$\theta(\text{N10-C9a-C5a-N5})$	7.15	4.88	0.48	-1.50	4.53	3.02	-0.30	-1.59
$\theta(\text{N10-C10a-C4a-N5})$	4.80	7.60	20.29	19.73	5.38	5.99	13.33	18.24
$\theta(\text{N1-C10a-C4a-C4})$	5.07	8.25	11.53	8.55	1.94	3.67	7.61	11.12
$\theta(\text{N1-C2-N3-C4})$	7.13	7.51	14.79	11.73	10.93	11.59	18.68	17.77
$\theta(\text{N1-C10a-C4a-N5})$	-175.34	-173.16	-161.70	-161.28	-175.60	-176.20	-165.77	-164.00
$\theta(\text{N10-C10a-C4a-C4})$	-174.80	-170.99	-166.47	-170.44	-177.08	-174.14	-173.30	-166.64
$\theta(\text{C9a-N10-C10a-C4a})$	-1.74	-11.77	-37.52	-39.91	0.71	-4.81	-22.12	-34.54
$\theta(\text{C10a-C4a-N5-C5a})$	-1.67	3.54	9.75	12.03	-6.38	-2.24	2.66	8.85
$\theta(\text{C6-C5a-N5-C4a})$	176.71	-174.19	-155.17	-153.97	173.39	179.89	-166.97	-156.44
$\theta(\text{C5a-N5-C4a-C4})$	177.85	166.84	149.28	150.25	-176.83	175.32	164.43	150.33
$\theta(\text{C14-H15-N5})$		152.10				151.08		
R(N11-C4a)	2.78	2.63	3.24	2.84	2.81	2.72	3.02	2.90

Table S2. MODEL IIa ve MODEL IV için hesaplanan enerji (E), Gibbs serbest enerji (G) değerleri (au) ve imaginary frekansları.

(a) PM6 ve CPCM//M06-2X/6-31+G(d,p)//PM6 metotları ile MODEL IIa sonuçları.

	MODEL IIa-cFAD-shl				
	E	G	Tek nokta E	G correction	Imaginary frekans
RC	-1.17382502	-0.231974	-4363.804717	0.941852	
TS	-1.12639747	-0.186326	-4363.767506	0.940072	-1691.7
PC - +	-1.19593130	-0.248288	-4363.805305	0.947449	
TS _{inv}	-1.19588461	-0.247872	-4363.806857	0.948013	-147.07
PC _{inv}	-1.20160732	-0.252339	-4363.814550	0.949268	
TS _{N5-PC}	-1.18754511	-0.242536	-4363.816629	0.945009	-141.02
N5 _{yl}	-1.19665223	-0.249548	-4363.805566	0.947104	
TS _{H2O}	-1.18365757	-0.243322	-4363.797434	0.940336	-880.35
PC	-1.19306579	-0.248614	-4363.805498	0.944452	

(b) ONIOM (M062X/6-31+G(d,p)):PM6 metodu ile hesaplanan kovalent bağı MODEL-Ia-shl sonuçları.

	MODEL Ia-cFAD-shl			MODEL Ia-nFAD-shl		
	E	G	Imaginary frekans	E	G	Imaginary frekans
RC	-2112.141806	-2111.123297		-2113.348535	-2112.31121	
TS	-2112.102057	-2111.086940	-1284.51	-2113.304300	-2112.27284	-1370.88
PC_{inv}	-2112.148398	-2111.129189		-2113.351678	-2112.31566	
TS_{N5-PC}	-2112.139992	-2111.116063	-94.79	-2113.348480	-2112.30804	-110.06
N5_{yl}	-2112.141004	-2111.117167		-2113.349169	-2112.30883	
TS_{H2O}	-2112.128868	-2111.114748	-927.68	-	-	
PC	-2112.137444	-2111.120295		-	-	

(c) PM6 metodu ile hesaplanan kovalent bağı MODEL IV-shl sonuçları.

	MODEL IVcFAD-shl			MODEL IVnFAD-shl		
	E	G	Imaginary frekans	E	G	Imaginary frekans
RC	-1.80851232	0.108749		-1.83687050	0.093597	
TS	-1.76685682	0.148773	-1634.51	-1.79406471	0.135126	-1636.45
PC_{inv}	-1.84018863	0.080058		-1.86586533	0.070013	
TS_{N5-PC}	-1.83585971	0.081824	-151.22	-1.86194113	0.071056	-116.54
N5_{yl}	-1.84432014	0.075080		-1.87400333	0.066156	

(d) ONIOM (M062X/6-31+G(d,p)):PM6 metodu ile hesaplanan kovalent bağı MODEL IV-shl sonuçları.

	MODEL IVcFAD-shl			MODEL IVnFAD-shl		
	E	G	Imaginary frekans	E	G	Imaginary frekans
RC	-2112.771263	-2110.785479		-2113.976982	-2111.97318	
TS	-2112.729699	-2110.749556	-1224.9	-2113.934608	-2111.93429	-1328.35
PC_{inv}	-2112.775427	-2110.790833		-2113.969874	-2111.97087	
TS_{N5-PC}	-	-		-	-	
N5_{yl}	-2112.779482	-2110.785078		-2113.980879	-2111.96999	

Tablo S3. CPCM/M062X/6-31+G(d,p)//PM6 metodu ile hesaplanan MODEL IIa-shl'a ait önemli atomların NBO yükleri^a.

	RC	TS	PC -₊	TS_{inv}	PC_{inv}	TS_{N5-PC}	N5_{yl}	TS_{H2O}	PC
O1	-0.67	-0.71	-0.83	-0.83	-0.83	-0.80	-0.81	-0.79	-0.76
C4	0.74	0.70	0.64	0.64	0.64	0.66	0.67	0.66	0.67
C4a	0.12	-0.01	-0.11	-0.11	-0.12	-0.12	-0.15	-0.10	-0.08
N5	-0.37	-0.51	-0.67	-0.67	-0.71	-0.60	-0.54	-0.70	-0.69
N11	-0.98	-0.82	-0.71	-0.71	-0.71	-0.79	-0.92	-0.74	-0.75
H12	0.43	0.49	0.51	0.51	0.51	0.48	0.44	0.53	0.55
H13	0.41	0.44	0.47	0.47	0.47	0.46	0.43	0.43	0.40
C14	-0.29	-0.18	0.27	0.27	0.28	0.21	0.12	0.22	0.15
H15	0.23	0.32	0.47	0.47	0.47	0.48	0.53	0.47	0.47
H16	0.23	0.27	0.26	0.27	0.27	0.28	0.28	0.24	0.23
N1	-0.66	-0.68	-0.70	-0.69	-0.70	-0.69	-0.68	-0.75	-0.69
C10	0.48	0.50	0.46	0.46	0.46	0.48	0.49	0.52	0.50
FAD	-0.27	-0.66	-0.98	-0.98	-0.99	-0.77	-0.49	-0.79	-0.12
SER	0.02	0.22	0.82	0.83	0.85	0.67	0.39	0.13	-0.02

^aFAD ve SER flavin ve serotonin yapılarındaki tüm atomların toplam NBO yüklerini temsil etmektedir.

Tablo S4. Deneysel ve teorik hız sabiti hesapları^a

Substrat	MAO-A		MAO-B	
	k_{cat}	ΔG^\ddagger	k_{cat}	ΔG^\ddagger
Serotonin (Deneysel) (O ₂ ortamında)	198	16.75	61	17.44
Serotonin (Deneysel) (hava ortamında)	183	16.79	33	17.81
Dopamin (Deneysel) (O ₂ ortamında)	75	17.32	277	16.55
Dopamin (Deneysel) (hava ortamında)	71	17.35	65	17.41
Serotonin(teorik) (Doğal Enzim)	-	-	1.98x10 ⁻⁴	22.50
Serotonin(teorik) (Mutant Enzim)	-	-	8.1x10 ⁻⁶	24.40

^aDeneysel hız sabitlerinin aktivasyon enerjisine dönüşümü ve teorik aktivasyon enerjilerinin hız sabitine dönüşümü için aşağıdaki denklem kullanılmıştır.

$$k = \frac{k_b \cdot T}{h \cdot c^0} \cdot e^{-\Delta G^\ddagger / RT}$$

k: Reaksiyon hız sabiti

k_b: Boltzman sabiti = 3.30x10⁻²⁴

T: Sıcaklık (K) = 298.15 K

h: Planck sabiti = 1.58x10⁻³⁴

c: Konsantrasyon = 1 kkal/mol

R: Gaz Sabiti = 1.987 kal/mol.K

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Kübra ÇAKIR

Doğum Yeri: Kadıköy/İSTANBUL

Doğum Tarihi: 02.05.1991

İletişim: kubracakir-27@hotmail.com

Eğitim Bilgileri

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (2013-2016)

Marmara Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü (2009-2013)

İstanbul Üsküdar Lisesi/İST (2005-2009)

Sözlü Bildiri ve Poster Bildiri:

1. **K. Çakır**, H. Engin, V. E. Atalay, S. S. Erdem, Nörotransmitter Aminlerin MAO Enzimi ile Oksitlenme Mekanizmasının PM6 Yöntemiyle Modellenmesi, 1.Ulusal Hesaplamalı Kimya Çalıştayı, 29-31 Mayıs 2014, Van (Poster)
2. **H. Engin**, K. Çakır, V. E. Atalay, S. S. Erdem, Monoamin Oksidaz Enziminin Nörotransmitter Aminleri Oksitleme Mekanizmasına Elektron-çekici Grupların Etkisinin İncelenmesi, 1.Ulusal Hesaplamalı Kimya Çalıştayı, 29-31 Mayıs 2014, Van (Poster)
3. M. A. Akyüz, V. E. Atalay, H. Engin, K. Çakır, **S. S. Erdem** Computational Modeling of Monoamine Oxidase Catalysis: Concerted or Stepwise Hydride Transfer Mechanism?, 5th EuCheMS Chemistry Congress, 31 Ağustos-4 Eylül 2014, İstanbul, Turkey (Poster)

4. **K. Çakır**, H. Engin, V. E. Atalay, S. S. Erdem, Monoamin Oksidaz (MAO) Enzimindeki Kovalent Bağlı Flavinin Amin Katalizleme Mekanizmasına Etkisi, 2.Ulusal Organik Kimya Kongresi, 24-26 Ekim 2014, Ankara (Poster)
5. **H. Engin**, K. Çakır, V. E. Atalay, S. S. Erdem, Nörotransmitter Aminlerin MAO Enzimi ile Oksitlenme Mekanizmasının M062X Yöntemiyle Modellenmesi: Hidrür Transferi, 2.Ulusal Organik Kimya Kongresi, 24-26 Ekim 2014, Ankara (Poster)
6. M. A. Akyüz, H. Engin, K. Çakır, V. E. Atalay, **S. S. Erdem**, Monoamin Oksidaz Enzimi Hidrür Mekanizmasının HOMO Moleküler Orbitaler ile Desteklenmesi, 2.Ulusal Organik Kimya Kongresi, 24-26 Ekim 2014, Ankara (Poster)
7. **K. Çakır**, H. Dülger, V. E. Atalay, S. S. Erdem, Monoamine Oksidaz Enzimindeki Flavin-N5 Araürün Oluşumu: Kataliz mi, İnhibisyon mu?, 2.Ulusal Hesaplamalı Kimya Kongresi, 2-5 Haziran 2015, Kars (Poster)
8. **H. Dülger**, K. Çakır, V. E. Atalay, S. S. Erdem, Monoamin Oksidaz Enzimi Tarafından Katalizlenen Dopamin Oksidasyon Mekanizmasının Modellenmesi, 2.Ulusal Hesaplamalı Kimya Kongresi, 2-5 Haziran 2015, Kars (Poster)
9. M. A. Akyüz, V. E. Atalay, K. Çakır, H. Dülger, **S. S. Erdem**, MonoaminOksidaz Enzimleri Nörotransmitter Aminlerin Yükseltgenmesini Nasıl Katalizler? 2.Ulusal Hesaplamalı Kimya Kongresi, 2-5 Haziran 2015, Kars (Sözlü sunum)

Projelerde Yaptığı Görevler:

1. Monoamin Oksidaz A ve B Enzimlerinin Nörotransmitter Aminleri (Serotonin/Dopamin) Oksitlemesi Aynı Mekanizmayla mı Farklı Mekanizmalarla mı Gerçekleşir?, TÜBİTAK-1001-KBAG113Z616 Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı – Bursiyer