

Računalno istraživanje mehanizma ireverzibilne inhibicije enzima monoamin-oksidge B

Tandarić, Tana

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:053338>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Tana Tandarić

**RAČUNALNO ISTRAŽIVANJE MEHANIZMA
IREVERZIBILNE INHIBICIJE ENZIMA MONOAMIN-
OKSIDAZE B**

DOKTORSKI RAD

Mentor:
dr. sc. Robert Vianello

Zagreb, 2021.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Tana Tandarić

**COMPUTATIONAL INVESTIGATION OF THE
MECHANISM OF THE IRREVERSIBLE INHIBITION OF
THE MONOAMINE OXIDASE
B ENZYME**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:
Dr. Robert Vianello

Zagreb, 2021

Ova disertacija izrađena je u Grupi za računalnu organsku kemiju i biokemiju Zavoda za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom dr. sc. Roberta Vianella u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Organske kemije pri Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Računi su izvedeni na računalnom serveru Isabella u sklopu Sveučilišnog računskog centra (SRCE) Sveučilišta u Zagrebu, te na računalnim klasterima u Sloveniji (Kemijski Institut u Ljubljani).

*...A u svitanje nestaje mjesec i javlja se nepomućeno sunce.
Ja sam tvrđava sa jedinom zastavom srca.
Tvrđava koja se ne predaje.
Ne predaju se mrtvi oslobođeni svojih čula.
Ne predaju se munje u brzom letu.*

*Ne predaju se živi sa draguljima očiju.
Utvrde se predaju, ali ne ova od sna.
Same se daju i same otimaju.
Ja sam tvrđava sa jedinom zastavom srca.*

Zahvale:

Veliku zahvalnost iskazujem svom mentoru dr.sc. Robertu Vianellu na poklonjenom znanju i vremenu, a najviše od svega, na pruženoj prilici. Boljeg mentora nisam mogla naći.

Prof. dr. sc. Janezu Mavriju, dr.sc. Jerneju Stare i Alji Prah na gostoprimstvu u Ljubljani i velikoj pomoći prilikom izrade ovog doktorata.

Prof. dr. sc. Valeriju Vrčeku koji me uveo u svijet računalne kemije.

Doc. dr. sc. Davoru Šakiću, zato što je najveća potpora i najveći kritičar u isto vrijeme.

Dr. sc. Mariji Pandži, koja me upoznala sa znanstvenim istraživanjem.

Danielu Vrčiću i ostalima na održavanju klastera Isabella; nadam se da se ne smrznete kad vidite moj mail.

Josipi, Pavici i Ani, što me trpe od prvog „pulovalnog“ signala.

Hrvoju i Marijanu, za potporu, savjete i pomoć. I zajedničke krige piva.

Petri, za potporu u izradi doktorata i ispijanju šljivovice.

Niki, za naše predivno prijateljstvo.

Tomislavu, Mihaelu, Luciji, Juraju i Maji, na recenziji i pomoći u kritičnim trenucima.

Natali, na recenziji i čaši vina. Čašama.

Mojoj obitelji, Mikiju, mami, Baltazaru i Dori, što su me pratili tijekom cijelog mog puta.

Mojoj baki, koja je uvijek vjerovala u mene.

Mariju, za svu ljubav i strpljenje koje ima za mene. Znam da ga treba puno.

Mojoj mački, Belli. Hvala ti što si poslušala sva moja predavanja bez ijednog komentara.

Sadržaj

SAŽETAK	XI
ABSTRACT	XIII
§ 1. UVOD	1
1.1. Cilj i hipoteze rada	2
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Monoamin-oksidge	4
2.2. Izoforme monoamin-oksidge i njihova distribucija po tkivima	5
2.3. Aktivno mjesto monoamin-oksidge	7
2.4. Katalitički mehanizam monoamin-oksidge	9
2.5. Klinički značaj monoamin-oksidge	12
2.5.1. <i>Razvoj inhibitora monoamin-oksidge</i>	13
2.5.2. <i>Razvoj selektivnih inhibitora monoamin-oksidge</i>	14
§ 3. TEORIJSKA OSNOVICA RAČUNALNIH METODA	19
3.1. Osnove kvantne mehanike	19
3.1.1. <i>Schrödingerova jednadžba</i>	19
3.1.2. <i>Born-Oppenheimerova aproksimacija</i>	20
3.1.3. <i>Načelo varijacije</i>	22
3.2. Elektronska korelacija	25
3.3. Teorija funkcionala gustoće	26
3.3.1. <i>Metode lokalne gustoće</i>	29
3.3.2. <i>Metode poboljšane gradijentom</i>	31
3.3.3. <i>Metode poboljšane gustoćom kinetičke energije</i>	33
3.4. Skupovi osnovnih funkcija	34
3.4.1. <i>Orbitale Slaterovog i Gaussovog tipa</i>	34
3.4.2. <i>Popleovi skupovi osnovnih funkcija</i>	38
3.5. Solvatacijski efekti	39
3.6. Osnove kvantno-kemijskih izračuna	40
3.6.1. <i>Optimizacija geometrija</i>	41
3.6.2. <i>Frekvencijski račun</i>	42
3.7. Molekulska dinamika	43
3.7.1. <i>Izračun Gibbsovih energija</i>	52
3.8. Izučavanje enzimskih reakcija računalnim metodama	54
3.8.1. <i>Klasterni model i QM/MM pristup</i>	54

3.8.2. Empirijska valentna veza (EVB)	55
3.9. Priprema računalnih simulacija	58
3.9.1. Parametri MD simulacija	58
3.9.2. Parametri QM klasternih simulacija	60
3.9.3. Priprema EVB simulacija	61
3.9.4. Priprema referentne reakcije za kalibraciju EVB metode	62
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	64
4.1. Molekulsko-dinamičke simulacije enzima MAO B u kompleksu s propargilaminskim inhibitorima	64
4.1.1. Rezultati MD simulacija komercijalnih inhibitora.....	64
4.1.2. Rezultati MD simulacija derivata komercijalnih inhibitora	72
4.2. Mehanizam ireverzibilne inhibicije MAO B propargilaminskim inhibitorima	76
4.3. EVB simulacije reakcije ireverzibilne inhibicije enzima MAO B propargilaminskim inhibitorima	91
4.3.1. Parametri EVB simulacija	91
4.3.2. Rezultati EVB simulacija komercijalnih inhibitora	91
4.3.3. Rezultati EVB simulacija derivata komercijalnih inhibitora	94
§ 5. ZAKLJUČAK	96
§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ.....	98
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	102
§ 8. ŽIVOTOPIS	XV



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

RAČUNALNO ISTRAŽIVANJE MEHANIZMA IREVERZIBILNE INHIBICIJE ENZIMA MONOAMIN-OKSIDAZE B

Tana Tandarić
Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, 10 000

Monoamin-oksidaza B (MAO B) je flavoenzim koji regulira razinu endogenih i egzogenih amina u organizmu, uključujući neurotransmitere u mozgu. Predstavlja glavnu farmakološku metu u terapiji Parkinsonove i Alzheimerove bolesti. U sklopu ove disertacije proučen je mehanizam inhibicije MAO B ireverzibilnim selektivnim propargilaminskim inhibitorima, razagilinom i selegilinom te njihovim derivatima desmetilselegilinom i *N*-metilrazagilinom. Kvantno-kemijskom analizom unutar klasternog modela pokazano je da se inhibicija odvija u tri koraka. U prvom koraku, koji određuje ukupnu brzinu reakcije, flavinski kofaktor odcjepljuje hidridni ion s α -metilenske skupine supstrata. Dobiveni reakcijski profili i konačna struktura inhibiranog enzima u skladu su s eksperimentalnim podacima. Predloženi mehanizam dodatno je okarakteriziran empirijskim pristupom teorije empirijske valentne veze (EVB), koji uključuje cjelokupnu strukturu promatranog enzima. Simulacijama molekulske dinamike (MD) ispitane su termodinamika vezanja te interakcije inhibitora s aminokiselinama u aktivnom mjestu. Ostvareni rezultati od velike su važnosti za razvoj novih i efikasnijih MAO B inhibitora za kliničku primjenu.

(112 stranica, 41 slika, 9 tablica, 208 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: EVB simulacije/ ireverzibilna inhibicija enzima/ kvantna mehanika/ molekulska dinamika/ monoamin-oksidaza B/ računalna kemija/ reakcijski mehanizam/

Mentor: dr. sc. Robert Vianello, znanstveni savjetnik

Rad prihvaćen: 4. studenog 2020.

Ocjenitelji:

1. izv. prof. dr. sc. Branimir Bertoša, Prirodoslovno-matematički fakultet
2. dr. sc. Darko Babić, v. zn. sur., Institut Ruđer Bošković
3. doc. dr. sc. Ivan Kodrin, Prirodoslovno-matematički fakultet



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

COMPUTATIONAL INVESTIGATION OF THE MECHANISM OF THE IRREVERSIBLE INHIBITION OF THE MONOAMINE OXIDASE B ENZYME

Tana Tandarić

Ruđer Bošković Institute, Bijenička cesta 54, 10 000 Zagreb

Monoamine oxidase B (MAO B) is a flavoenzyme responsible for the regulation of exogenic and endogenic amine levels in the human body, including amine neurotransmitters in the brain. This enzyme represents a crucial pharmacological target for treating Parkinson's and Alzheimer's diseases. This dissertation elucidates the mechanism of the irreversible MAO B inhibition with clinical propargylamine inhibitors, rasagiline and selegiline, and their derivatives desmethyl-selegiline and methyl-rasagiline. The quantum-chemical analysis within the cluster model showed that this reaction proceeds in three steps, with the rate-limiting abstraction of the inhibitor's α -methylene H^- anion by FAD in the first step. The obtained results are in excellent agreement with experimental observations. The proposed mechanism is further characterized by the Empirical Valence Bond approach on the entire enzyme structure, whereas molecular dynamics simulations identified residues crucial for the binding. The offered insight provides important guidelines for the development of new and more effective MAO B inhibitors.

(112 pages, 41 figures, 9 tables, 208 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: computational chemistry/ enzyme irreversible inhibition/ EVB simulation/ molecular dynamics/ monoamine oxidase B/ quantum mechanics/ reaction mechanism/

Supervisor: Dr. Robert Vianello, Senior Scientist

Thesis accepted: 4th November 2020.

Reviewers:

1. Dr. Branimir Bertoša, Associate Professor, Faculty of Science
2. Dr. Darko Babić, Senior Research Associate, Ruđer Bošković Institute
3. Dr. Ivan Kodrin, Assistant Professor, Faculty of Science

§ 1. UVOD

Monoamin-oksidge (MAO) obitelj su flavoenzima koji kataliziraju oksidaciju monoamina u odgovarajuće aldehide, koristeći molekularni kisik za regeneraciju flavin-adenin-dinukleotid (FAD) kofaktora. Nalazimo ih vezane za vanjsku membranu mitohondrija u svim vrstama stanica u tijelu. Prvi takav enzim otkrila je još 1928. Mary Bernheim¹ u homogenatu tkiva jetre i tada je, prema supstratu kojeg katalizira, nazvan tiramin-oksidge. Do sada su otkrivene dvije izoforme tog enzima, MAO A i MAO B, koje se razlikuju kako po lokalizaciji u tkivima, tako i po selektivnosti prema supstratima i inhibitorima.^{2,3}

MAO enzimi izuzetno su bitni u katabolizmu monoamina u ljudskom tijelu, bilo egzogenih amina unesenih hranom ili endogenih poputaminskih neurotransmitera (noradrenalin, serotonin, dopamin i dr.). Zbog uloge u razgradnji neurotransmitera, MAO enzimi uključeni su u nastanak i razvoj mnogih neuroloških i psihijatrijskih oboljenja. Upravo ireverzibilna inhibicija MAO enzima predstavlja ključan farmakoterapijski pristup u liječenju navedenih bolesti.

Sredinom 20. stoljeća neselektivni ireverzibilni inhibitori MAO enzima korišteni su u terapiji depresivnih poremećaja, no zbog brojnih nuspojava i restrikcija u prehrani, danas su ovi lijekovi zastarjeli i zamijenjeni onima povoljnijeg farmakoterapijskog profila. Selektivni ireverzibilni inhibitori MAO A zadržani su jedino u terapiji rezistentne depresije. Suprotno tome, ireverzibilni inhibitori MAO B, poput selegilina i razagilina, koriste se u terapiji neurodegenerativnih bolesti poput Parkinsonove i Alzheimerove bolesti. Inhibicija MAO B usporavanjem razgradnje dopamina i reduciranjem oksidativnog stresa u mozgu doprinosi ublažavanju simptoma kao i usporavanju progresije bolesti.

Starenjem populacije, neurodegenerativne bolesti postaju sve značajniji javnozdravstveni problem.⁴ Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (engl. *World Health Organization*, WHO), 2016. godine, demencije i druge neurodegenerativne bolesti postale su peti po redu globalni uzrok smrti, a samo Alzheimerova bolest zahvaća oko 30–60 % populacije starije od 85 godina, odnosno 45 milijuna ljudi globalno. Procjenjuje se da će do 2050. godine ovaj broj narasti na 135 milijuna ljudi.⁵

Ove bolesti uglavnom se liječe simptomatski i sa sobom donose znatne socioekonomske posljedice. Iz navedenih razloga, nužno je razviti inovativne oblike terapije ovakvih bolesti.

Ireverzibilni inhibitori MAO B enzima predstavljaju jedno od malobrojnih terapijskih rješenja.^{6,7} Međutim, iako su spojevi poput selegilina (SEL) i razagilina (RAS), ireverzibilnih inhibitora MAO B već više od 30 godina na tržištu,⁸ njihov točan molekularni mehanizam inhibicije još uvijek je nepoznanica u literaturi. Upravo zato, ovaj doktorat će se fokusirati na razjašnjenje mehanizma ireverzibilne inhibicije MAO B ovom klasom spojeva, kako bismo detaljnim poznavanjem mehanizma bili korak bliže prema novim, učinkovitijim inhibitorima povoljnijeg farmakološkog profila.

1.1. Cilj i hipoteze rada

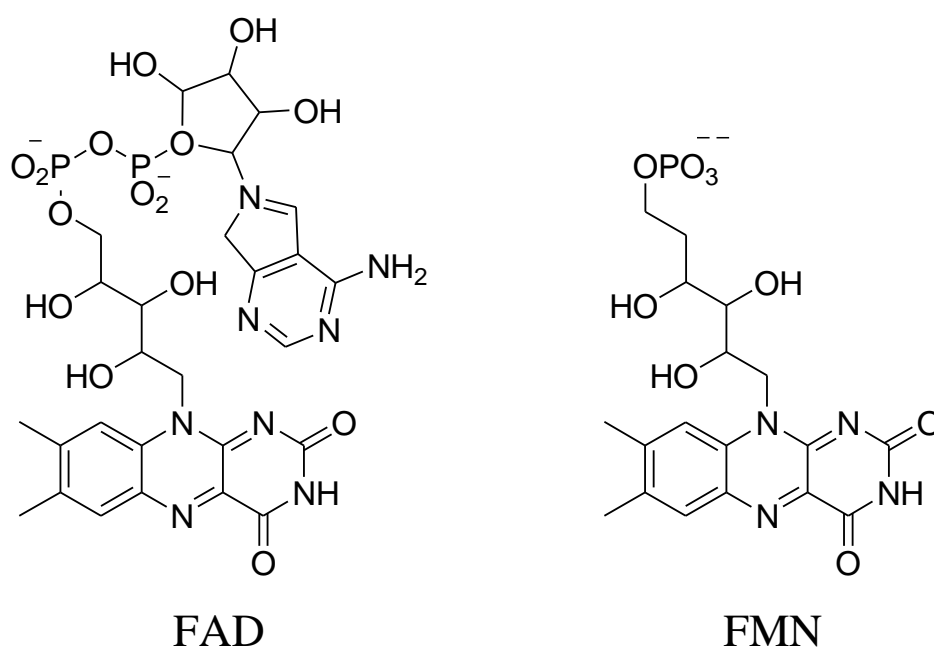
U okviru doktorske disertacije prvi cilj je razumijevanje preciznog molekularnog mehanizma ireverzibilne inhibicije MAO B enzima, što će pridonijeti boljem uvidu u način djelovanja komercijalno dostupnih lijekova, kao i otvoriti mogućnost razvoja novih inhibitora. Osnovna hipoteza je da je mehanizam ireverzibilne inhibicije analogan katalitičkom mehanizmu MAO B enzima, kod kojega u koraku koji određuje brzinu reakcije dolazi do prijenosa hidrida s molekule inhibitora na N5 atom u flavinskom prstenu kofaktora.⁹

Drugi cilj je dokazati da su arhitektura i svojstva aktivnog mjesta enzima te kemijska priroda inhibitora odgovorni za različitu selektivnost pojedinih inhibitora prema MAO B enzimu. Iz toga proizlazi da su razumijevanje nekovalentnih interakcija između enzima i inhibitora, zatim konformacijske dinamike enzima u kompleksu s inhibitorima te mehanizam inhibicije ovog enzima nužni za potpuni uvid u farmakološki ključnu reakciju ireverzibilne inhibicije MAO B. Hipoteza je da su Tyr435, Tyr398, Tyr326 te Ile199, aminokiseline koje tvore hidrofobni kavez u aktivnom mjestu MAO B, odgovorne za vezanje inhibitora, budući da je u literaturi pokazano da znatno utječu na vezanje supstrata.¹⁰⁻¹³

Koristeći dobiveni uvid i prikupljeno znanje, treći cilj obuhvaća dizajn novih inhibitora na temelju ustanovljenog mehanizma ireverzibilne inhibicije koji bi imali povoljnije termodinamičke i kinetičke profile reakcije inhibicije, kao i poboljšano vezanje u aktivno mjesto enzima.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

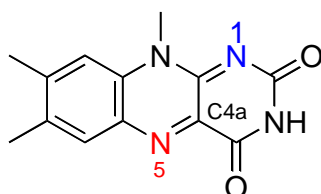
Flavoproteini su klasa proteina koji sadrže derivatizirani riboflavin (vitamin B2), ključan za njihovu biološku aktivnost.¹⁴ Riboflavin se enzimskom biosintezom prevodi u flavin-adenin-dinukleotid (FAD) ili flavin-mononukleotid (FMN) unutar živog organizma (Slika 1.) te, kao takav, služi kao prostetička grupa ili kofaktor flavoproteinu.¹⁵ Flavin je najčešće čvrsto vezan za protein nekovalentnim vezama, a u 5–10 % flavoproteina vezan je kovalentnom vezom, i to preko metilne skupine na položaju 8 flavinskog prstena, koja se veže na protein preko dušikova atoma N1 u histidinu ili sumpora u cisteinu, što je slučaj u promatranom MAO B enzimu. Strukture FMN i FAD sadrže triciklički heteroaromatski izoaloksazinski prsten (Slika 2.) koji reverzibilno može primiti ili otpustiti jedan ili dva elektrona. Upravo iz tog razloga većina enzima koji koriste FAD ili FMN kofaktore kataliziraju oksido-redukcijske reakcije u metaboličkim transformacijama.



Slika 1. Struktura flavin-adenin-dinukleotida (FAD) i flavin-mononukleotida (FMN).

U ljudskom genomu kodirano je 90 flavoproteina, od kojih oko 84 % za aktivnost treba FAD, dok 16 % treba FMN.¹⁴ Oba oblika, i FAD i FMN, zahtjeva svega pet proteina. Uzevši u obzir

da flavoproteini uglavnom vrše funkciju kao enzimi, i to u 90 % slučajeva kao oksidoreduktaze, ne iznenađuje činjenica da su najčešće smješteni unutar mitohondrija. Osim toga, 10 % njih otpada na enzime poput transferaza, izomeraza, ligaza i liaza. Flavin-ovisni proteini imaju važnu ulogu u biosintezi drugih esencijalnih kofaktora poput koenzima A, koenzima Q, hema, piridoksal-fosfata, a uključeni su također u metabolizam steroidnih i hormona štitnjače te folata.^{14,16}



Slika 2. Izoaloksazinski prsten s označenim brojevima atoma unutar prstena.

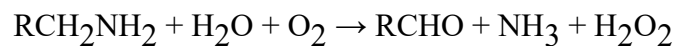
Flavoproteini sudjeluju u brojnim ključnim anaboličkim i kataboličkim biološkim putevima te zbog toga mutacije u genima koji ih kodiraju mogu dovesti do teških poremećaja u funkcioniranju organizma, uključujući poremećaje u staničnoj energetici i nakupljanje toksičnih međuprodukta. Ovakvi poremećaji uglavnom su inkompatibilni sa životom ili dovode do teškog poremećaja u razvoju organizma. Osim toga, poremećaji u njihovoj funkciji pojavljuju se u podlozi mnogih poligenskih oboljenja, a određeni genetski polimorfizmi uvjetuju veću sklonost razvoju kroničnih oboljenja poput psihijatrijskih bolesti,^{17–19} dijabetesa²⁰ i kardiovaskularnih oboljenja.²¹

Amin-oksidaze predstavljaju jednu od biološki najvažnijih skupina flavoproteina, a uključuju poliamin-oksidazu (PAO), amin-oksidazu lijevih amino kiselina (LAO) te različite monoamin-oksidaze (MAO). Kod nižih eukariota i bakterija njihova uloga uglavnom obuhvaća osiguravanje amonijaka za potrebe metabolizma, a PAO²² je kod biljaka, bakterija i praživotinja uključen u katabolizam poliamina. Kod kralježnjaka, izoforme MAO enzima igraju važnu ulogu u reguliranju razina različitih amina, oksidirajući ih u odgovarajući aldehid i vodikov peroksid, što uključuje biogene amine poput aminskih neurotransmitera, neurotoksina i ostalih amina prisutnih u organizmu, unesenih putem hrane ili nusprodukata katabolizma.^{23,24}

2.1. Monoamin-oksidaze

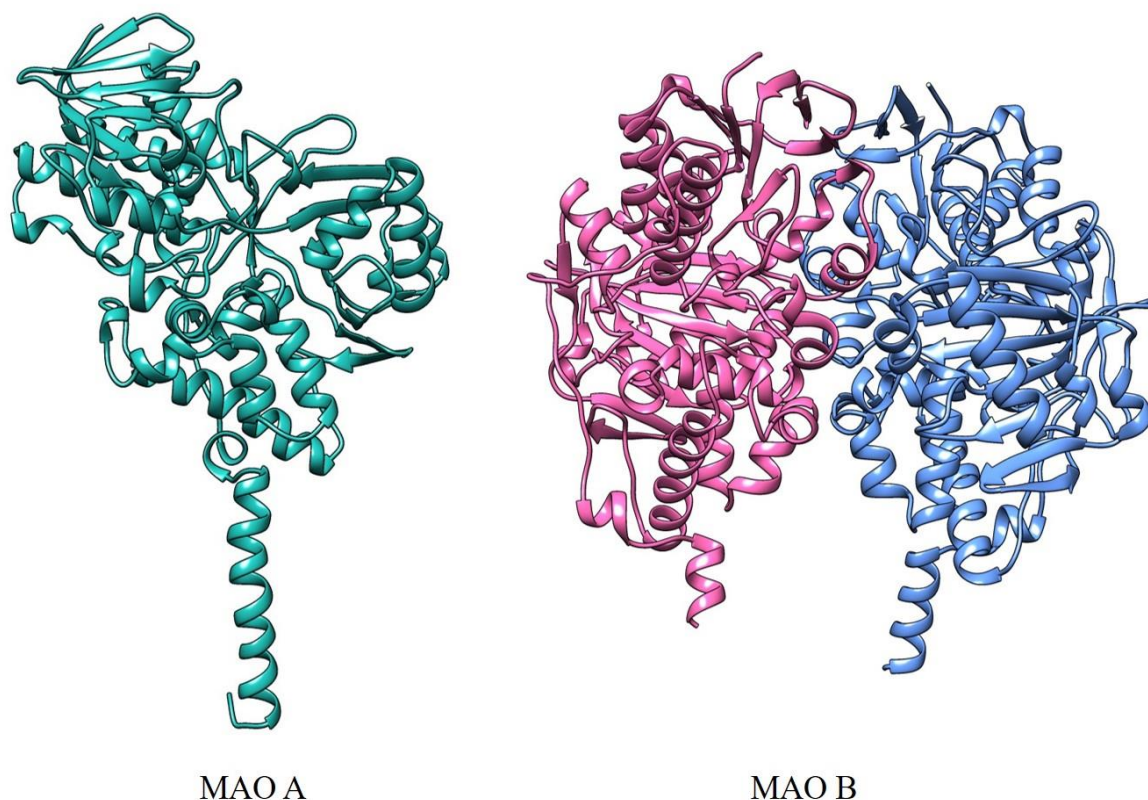
Monoamin-oksidaze (EC; engl. *Enzyme commission number* 1.4.3.4) su enzimi koji kataliziraju oksidativno cijepanje biogenih alkilamina pomoću molekularnog kisika te kao produkte daju odgovarajući aldehid i amonijak.²⁵ Za njihovu katalitičku aktivnost ključan je

flavinski kofaktor FAD koji je kovalentno vezan za bočni ogranak cisteina u aktivnom mjestu enzima.¹⁴ Sumarno, reakcija se može napisati kao:



2.2. Izoforme monoamin-oksidaze i njihova distribucija po tkivima

U ljudskom organizmu nalazimo dvije izoforme MAO enzima: MAO A i MAO B. Obje su vezane na vanjsku membranu mitohondrija; MAO A kao monomer, a MAO B kao dimer (Slika 3.). Izoforme MAO enzima strukturno su slične do 70 % na razini primarne strukture, no usprkos tome, postoje značajne razlike u supstratnoj specifičnosti,²⁴ kao i u selektivnoj osjetljivosti na inhibitore.²⁶ Kodirani su dvama bliskima genima na X kromosomu,²⁷ a studije na MAO A i MAO B knock-out miševima^{28,29} pokazale su da ovi izoenzimi imaju različite funkcije te igraju važnu ulogu u regulaciji ponašanja i razvoju neuroloških poremećaja.

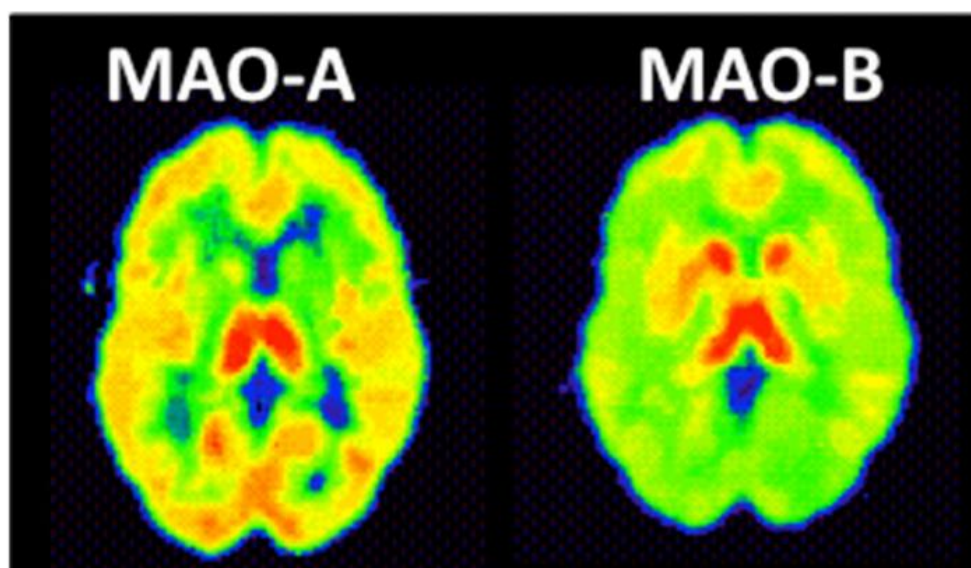


Slika 3. Kristalne strukture MAO A i MAO B (prikaz vrpčama).

Obje izoforme su zastupljene u centralnom živčanom sustavu, poglavito u neuronima i astroglijama, gdje su zadužene za degradaciju aaminskih neurotransmitera. Unutar velikog

mozga (Slika 4.), visoke razine obe izoforme nalazimo u hipotalamusu i hipokampalnom unku, dok je MAO B izrazito zastupljen u striatumu i globusu pallidusu. U korteksu nalazimo relativno visoke razine MAO A, uz iznimku cingularnog korteksa koji ima podjednak udio objiju izoformi. Po vrsti neurona u kojima ih nalazimo, MAO A prevladava u serotoninergičnim neuronima, dok MAO B nalazimo u dopaminergičnim i adrenergičkim neuronima.

Supstratna specifičnost izražena je kod MAO izoformi zbog čega MAO A preferabilno metabolizira serotonin, melatonin, noradrenalin i adrenalin. Feniletilamin i benzilamin bolji su supstrati za MAO B, dok su dopamin, triptamin i tiramin jednako dobri supstrati i za jednu i za drugu izoformu.³⁰



Slika 4. Distribucija izoformi MAO enzima u mozgu dobivena korištenjem pozitronske emisijske tomografije i selektivnih inhibitora MAO enzima označenih s ^{11}C (MAO A ^{11}C klorogilin, MAO B ^{11}C selegilin).³¹ Crvenom bojom označena su područja s većom koncentracijom enzima u tkivima.

Izvan centralnog živčanog sustava uglavnom nalazimo MAO A i to u organima koji su u kontaktu s vanjskim okolišem poput plućnog vaskularnog endotela,³² gastrointestinalnog trakta, jetre i placente. Glavna uloga MAO A u ovim tkivima je eliminacija aminskih ksenobiotika unesenih izvana (hranom, inhalacijom itd.). MAO B izvan središnjeg živčanog sustava nalazimo u trombocitima,³³ gdje ima ulogu u metabolizmu serotonina unutar tih stanica.

Tijekom razvoja čovjeka, MAO B postupno zamjenjuje MAO A, pa tako u mozgu novorođenčeta gotovo da ne možemo naći MAO B, dok je u odrasle osobe MAO B značajno

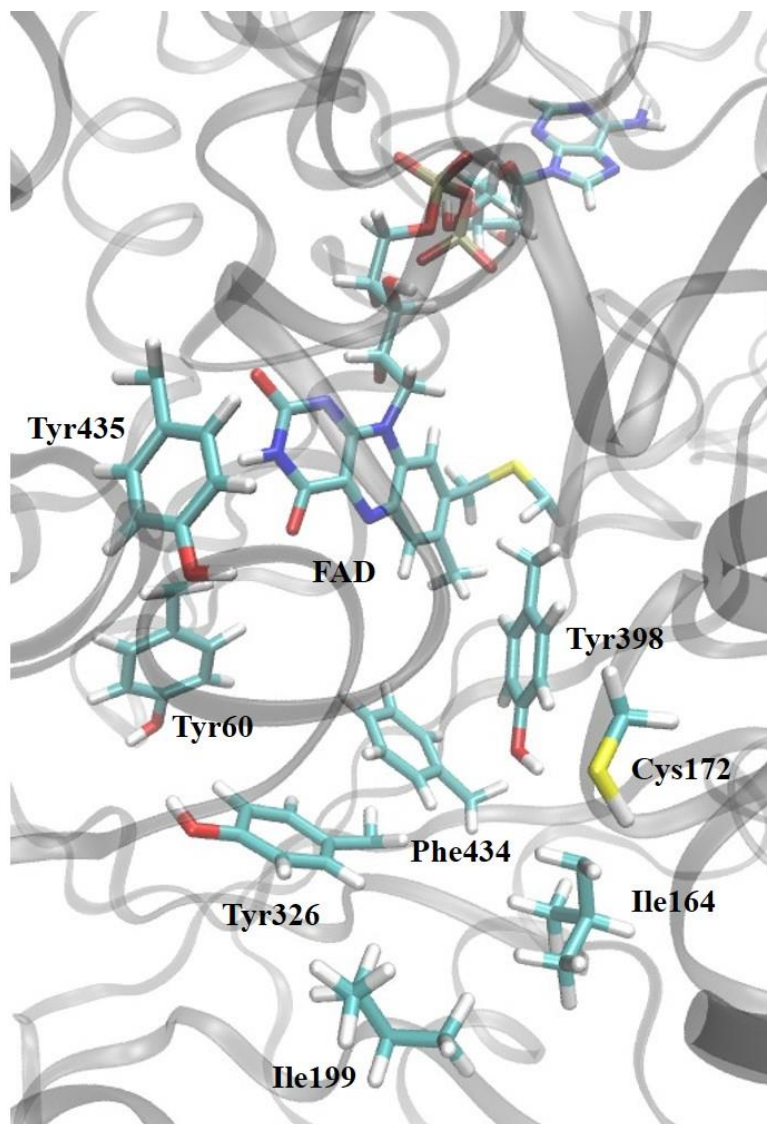
zastupljen u centralnom živčanom sustavu. Ovo ukazuje na to da je MAO A primitivnija izoforma.³⁴

2.3. Aktivno mjesto monoamin-oksidge

Izoforme MAO enzima dijele oko 70 % identičnih aminokiselinskih ostataka u primarnoj sekvenci, a preko 85 % aminokiselina je slično. Korištenjem usmjerenih točkastih mutacija (engl. *site-directed mutagenesis*) pronađene su četiri aminokiseline ključne za katalitičku aktivnost enzima; Lys305, Trp397, Tyr407, i Tyr444 u MAO A i odgovarajući aminokiselinski ostatci u MAO B, Lys296, Trp388, Tyr398 i Tyr435 (Slika 5.).³⁵ Mutacijom ovih aminokiselina dolazi do značajnog pada katalitičke aktivnosti MAO enzima, povećanja eksperimentalno izmjerene K_m konstante za pojedine supstrate, kao i do smanjenja konstante brzine enzimske reakcije. Ovo pokazuje da su navedeni aminokiselinski ostaci bitni za vezanju supstrata i za katalitičku aktivnost enzima.

Pretpostavlja se da navedeni Tyr ostaci stabiliziraju FAD kofaktor te formiraju tzv. „aromatski kavez” koji ima ulogu u vezanju supstrata (i inhibitora), na što ukazuju brojne studije.³⁶ Lys296 i Trp388, sudeći prema svom položaju u kristalnoj strukturi, vjerojatno sudjeluju u stabilizaciji kovalentno vezanog FAD kofaktora. Sličnost u utjecaju analognih mutacija na katalitičku aktivnost MAO izoformi, kao i preklapanja dotičnih aminokiselina te same tercijarne strukture u trodimenzijskom modelu aktivnog mjesta MAO enzima, ukazuje na to da ove aminokiseline imaju identične funkcije u objema izoformama.

Glavna razlika u strukturi aktivnog mjesta ljudskih MAO izoformi je u tome što MAO A ima jednodijelnu supstratnu šupljinu volumena približno 550 \AA^3 , dok je kod MAO B ova šupljina podijeljena u dva dijela: ulaznu šupljinu (volumena približno 290 \AA^3) i supstratnu šupljinu (volumena približno 400 \AA^3). Aminokiseline koje razdvajaju ove dvije šupljine kod MAO B su Ile199 i Tyr326¹⁰ te se iz tog razloga nazivaju još i „*gating residues*”. Pokazano je da mutacije ovih aminokiselina povećavaju K_m vrijednosti pojedinih amina, dok je konstanta brzine katalizirane reakcije nepromijenjena. Također, mijenja se i osjetljivost MAO B enzima na ireverzibilne neselektivne MAO inhibitore poput istatina.^{10,11} Ovo ukazuje na to da „*gating residues*” nisu zaslužne toliko za katalitičku aktivnost samog enzima koliko je njihova uloga bitna za vezanje samog supstrata odnosno inhibitora.¹³



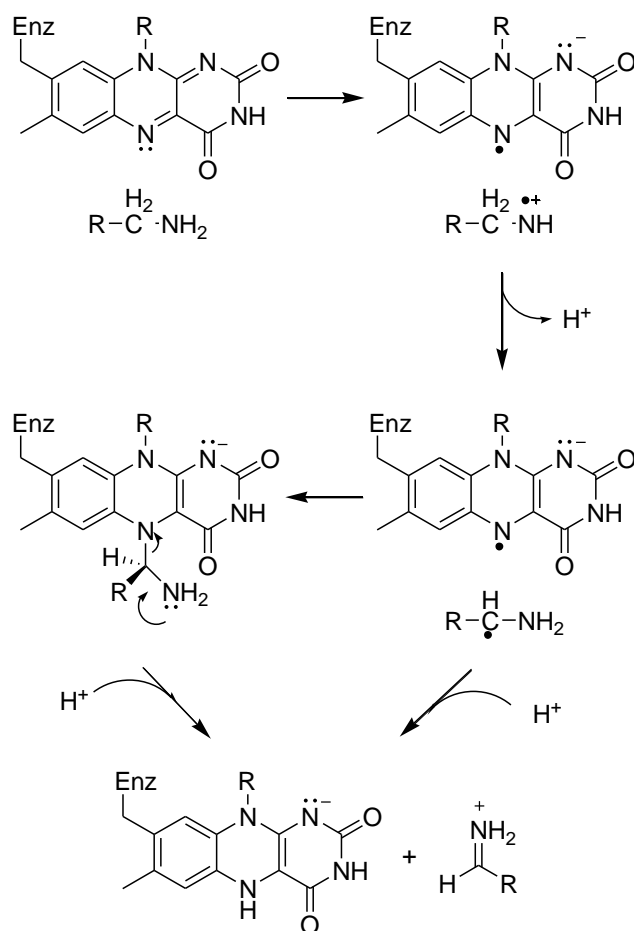
Slika 5. Aktivno mjesto MAO B s označenim FAD kofaktorom i relevantnim aminokiselinskim ostacima.

Osim gore navedenih, računalnim studijama pokazano je da Tyr188, Gln206 i Leu171 imaju bitnu ulogu u katalitičkoj aktivnosti MAO B. Kateholni prsten supstrata stabiliziran je interakcijom C–H \cdots π tipa između C–H skupina Leu171 i Ile199 te π sustava supstrata u kateholnom dijelu. Tyr188 predstavlja donji dio hidrofobne šupljine zajedno s Tyr435 i Tyr398, čime čini aktivno mjesto pogodnim za vezanje i katalizu raznovrsnih supstrata.¹²

2.4. Katalitički mehanizam monoamin-oksidaza

MAO enzimi kataliziraju oksidativnu deaminaciju monoamina.³⁷ U reduktivnom dijelu reakcije dolazi do oksidacije amina u odgovarajući imin uz istovremenu redukciju flavinskog kofaktora. Nakon toga, u oksidativnom dijelu dolazi do regeneracije kofaktora uz pomoć molekularnog kisika (O₂) uz nastajanje vodikova peroksida. Imin koji nastaje u kataliziranoj reakciji neenzimski se hidrolizira u odgovarajući aldehid i amonijak izvan aktivnog mjesta enzima.

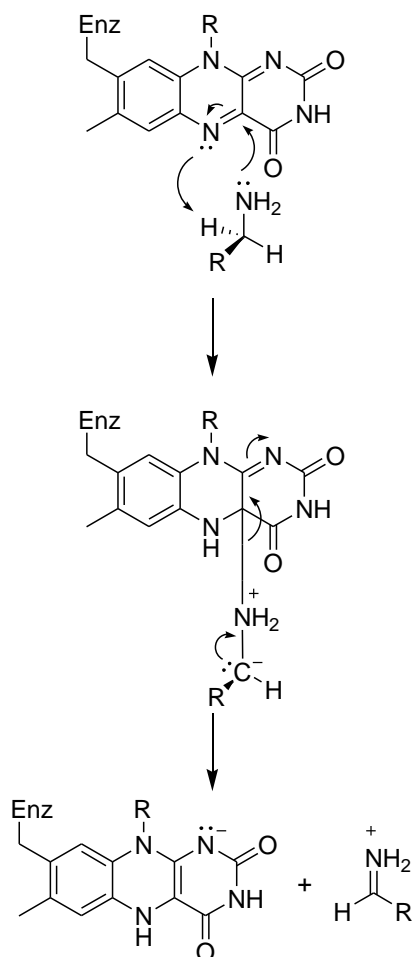
Reakcija oksidativne deaminacije koju kataliziraju MAO enzimi poznata je više od pola stoljeća. Usprkos tome, točan molekularni mehanizam još uvijek je predmet rasprava. U suštini dolazi do prijenosa vodika s C(α)-atoma amina, a svi do sada predloženi mehanizmi razlikuju se po prirodi atoma vodika koji prelazi. Tri su mehanizma predložena u literaturi: radikalski mehanizam³⁸ (dolazi do prijenosa vodikovog atoma, H), nukleofilni model³⁹ (dolazi do prijenosa protona, H⁺) te mehanizam prijenosa hidrida koji uključuje prijenos hidridnog aniona, H⁻ (Slika 6.). Sva tri mehanizma pojavljuju se u širokoj porodici flavoenzima te se može pretpostaviti da je katalitički mehanizam MAO enzima analogan jednom od njih. Kao potvrda ove pretpostavke uzima se činjenica da obje izoforme, MAO A i MAO B, pokazuju značajan kinetički izotopni efekt (KIE)⁴⁰ pri zamjeni procija s deuterijem (H/D) u molekuli aminskog supstrata (C(α)-vodikovi atomi), pa je očigledno da u koraku koji određuje brzinu reakcije dolazi do prijenosa nekog oblika vodika.



Slika 6. Predloženi radikalni katalitički mehanizam MAO B.

Prvi mehanizam (Slika 6.), predložen od strane Silvermana i sur.^{38,41,42}, uključuje prijenos vodikovog atoma, odnosno H radikala. Mehanizam je iniciran otpuštanjem jednog elektrona sa supstrata na kofaktor, nakon čega dolazi do deprotonacije supstrata ili do prijenosa protona⁴¹ i elektrona dolazi simultano (prenosi se H radikal na N5-atom flavinskog kofaktora), rezultirajući amskim radikalom kao međuproductom.^{38,43} Glavni dokaz koji podržava radikalni mehanizam je činjenica da su obje izoforme MAO inaktivirane ciklopropilaminskim analogima kojima se u procesu inhibicije otvara prsten, što je tipično za radikalne reakcije.⁴⁴ No eksperimenti provedeni od strane Edmondsona i sur.^{45,46}, kao i studije provedene elektronskom paramagnetskom rezonancijom (EPR)⁴⁷ te parametri određeni *stop-flow* kinetikom,⁴⁸ ne pokazuju dokaze o postojanju radikalnih međuproducta, kao niti utjecaj magnetskog polja na kinetiku reakcije,⁴⁹ zbog čega je radikalni mehanizam malo vjerojatan. Osim toga, Vianello i sur.⁹ računalnim metodama nisu identificirali biradikalni singletni sustav koji se očekuje kao

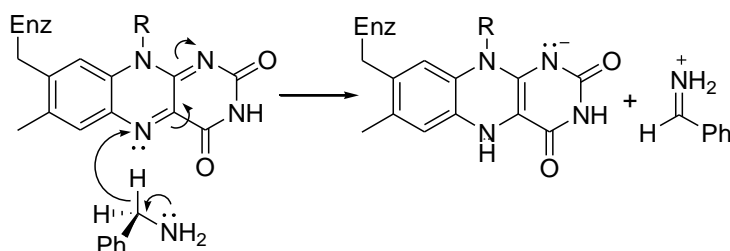
produkt prijenosa jednog elektrona, dok je tripletni biradikal energijski izrazito nepovoljan. Sve navedeno ukazuje da radikalni mehanizam nije operativan.



Slika 7. Predloženi polarni nukleofilni katalitički mehanizam MAO B.

S druge strane, Edmonson i Miller⁵⁰ pokazali su na seriji benzilaminskih supstrata da dodatak elektron-odvlačeće skupine u *para*-položaju povećava brzinu reakcije u slučaju MAO A, što sugerira da se tijekom reakcije generira anion, kojeg elektron-odvlačeće skupine stabiliziraju. To je navelo autore da predlože polarni nukleofilni mehanizam (Slika 7.),⁵⁰ koji u prvom koraku uključuje nastajanje visoko energijskog kovalentnog adukta koji se formira između aaminskog nukleofila i C4a atoma u flavinu, a nakon toga dolazi do raspada adukta na protonirani imin.⁵¹ Prijenos protona s C(α)-atoma na N5-atom flavina može se dogoditi prije ili nakon nastanka adukta. Najveći problem ovog mehanizma je što niti jedna skupina unutar aktivnog mjesta enzima nije dovoljno jaka baza da ukloni benzilni proton, budući da njegov pK_a tipično iznosi

oko 25.⁵²⁻⁵⁴ Vianello i sur. pokazali su računalnim metodama da je kinetička barijera potrebna za apstrakciju protona previsoka da bi reakcija bila vjerojatna.⁹



Slika 8. Predloženi hidridni katalitički mehanizam MAO B.

Treći mehanizam, predložen od strane Vianella i sur. (Slika 8.), pretpostavlja direktan i usklađen prijenos hidrida sa supstrata na N5-atoma flavina u prvom koraku cjelokupne reakcije. Izračunata kinetička barijera za ovaj proces povoljnija je u odnosu na ostale predložene mehanizme i iznosi 24,4 kcal mol⁻¹ (u sklopu „klaster modela“), odnosno 16,1 kcal mol⁻¹ (dobiveno korištenjem empirijskog modela valentne veze)^{55,56} za dopamin kao najučestaliji supstrat. Dobiveni rezultat u odličnom je slaganju s eksperimentalno dobivenom vrijednošću $\Delta G^\ddagger = 16,5$ kcal mol⁻¹.⁴⁵ Produkt ove reakcije je kovalentni adukt između N5 flavina i C(α) supstrata, nakon čega dolazi do intramolekulske pregradnje uz nastajanje slobodnog imina i reduciranog flavina. Vrijednosti izračunate za ovaj mehanizam izvrsno se slažu s eksperimentalnim, kinetičnim i termodinamičkim vrijednostima za obje izoforme enzima, kao i s KIE vrijednostima dobivenim za ovaj enzim.⁵⁷ Sve navedeno ukazuje na hidridni mehanizam kao najvjerojatniji katalitički mehanizam MAO enzima.

2.5. Klinički značaj monoamin-oksidaza

MAO enzimi imaju ključnu ulogu u inaktivaciji neurotransmitera pa se, upravo zbog toga, smatra da je disfunkcija MAO enzima (u smislu prevelike ili premale katalitičke aktivnosti) u podlozi brojnih psihijatrijskih i neuroloških poremećaja. Neuobičajeno visoke ili niske razine MAO enzima u organizmu povezane su s razvojem shizofrenije, depresije i poremećaja pažnje te migrenom, povećanom sklonošću razvoju ovisnosti, raznim tipovima demencija poput Parkinsonove i Alzheimerove bolesti, itd.

Inhibitori monoamin-oksidaza (MAOI) klasa su lijekova koji, reverzibilno ili ireverzibilno, inhibiraju MAO A ili MAO B, ili oba MAO enzima u isto vrijeme. Većina lijekova u kliničkoj praksi, koji djeluju na MAO enzime, su ireverzibilni inhibitori. Prvotno su

razvijeni kao antidepresivi,⁵⁸ no danas glavnu primjenu imaju u tretmanu neurodegenerativnih bolesti. MAO inhibitori djeluju tako da povećavaju razine monoaminskih neurotransmitera u mozgu,⁵⁹ te smanjuju oksidativni stres⁶⁰ i na taj način djeluju neuroprotektivno.⁶¹ Ova klasa lijekova učinkovita je u terapiji depresije (osobito atipični i rezistentni tipovi),⁶² a smatraju se prvom linijom u tretmanu Parkinsonove bolesti. Osim toga, MAOI korišteni su u liječenju paničnog poremećaja,⁶³ poremećaja u prehrani,⁶⁴ socijalne fobije,⁶⁵ agorafobije,⁶³ graničnog poremećaja ličnosti⁶⁶ te raznih tipova neurodegeneracije. Usprkos postojanju mnogih MAOI na tržištu, zbog širokog spektra poremećaja za čije liječenje se koriste, kao i njihove biokemijske složenosti, u cilju je razviti učinkovitije i selektivnije MAOI.

2.5.1. Razvoj inhibitora monoamin-oksidaza

Prvi poznati inhibitori MAO enzima bili su antituberkulinski hidrazidni spojevi upotrebljavani od sredine 20. stoljeća. Promatrajući pacijente s tuberkulozom, liječene izoniazidom, a kasnije iproniazidom, primijećene su psihološke promjene. Pacijenti na terapiji bili su vitalniji, društveniji, a neki su čak htjeli napustiti bolnicu.⁶⁷ Ubrzo nakon toga, napravljena su prva testiranja na ispitanicima oboljelima od depresije, pokazujući kod čak 70 % njih značajno poboljšanje.⁶⁸ Skovan je novi termin, antidepresiv, kako bi se opisalo djelovanje na pacijente. Nakon velikog uspjeha iproniazida uslijedili su spojevi koji su imali još veću sposobnost inhibicije MAO enzima,⁶⁹ poput izokarboksazida, tranciklopromina i ferelazina. Javljaju se i drugi hidrazinski derivati poput nialamida, mebanazina, i feniprazina, te indolski derivati poput triptamina. Od navedenih, najviše se ističe tranciklopromin, koji je zajedno s fenilazinom činio više od 90 % tržišta MAOI.⁷⁰

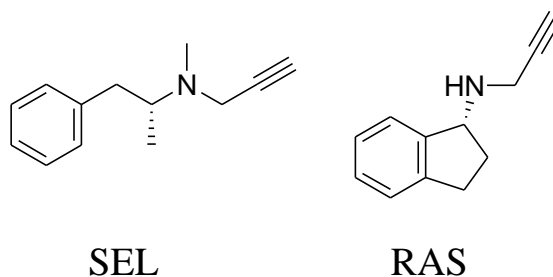
Zlatna era MAOI kao antidepresiva trajala je do 1961. godine kada je iproniazid povučen s američkog tržišta zbog nefrotoksičnosti.⁷¹ Također, pokazana je veća pojavnost žutice kod pacijenata tretiranih hidrazidnim MAOI, što je upućivalo na hepatotoksičnost. Štoviše, više od 50 % smrtnih slučajeva pacijenata na terapiji hidrazidnim MAOI bilo je povezano s otkazivanjem jetre. Ubrzo, svi hidrazidni MAOI povučeni su s tržišta. Jedini preostali bio je tranciklopromin, koji nije imao hidrazidnu strukturu pa se zbog toga smatrao sigurnim. No širok spektar nuspojava povezanih s povišenim koncentracijama biogenih amina u organizmu uzrokovao je 1964. godine povlačenje i ovog lijeka s tržišta. Naime, neselektivnom inhibicijom MAO enzima u cijelom organizmu može doći do previsokih razina biogenih amina u tijelu,⁷² poglavito zbog manjkave razgradnje amina, većinom tiramina, unesenih hranom. Zbog toga dolazi do adrenergičnih nuspojava poput agitacije, nesаницe, povišenog krvnog tlaka, jakih

glavobolja, subarahnoidalnih krvarenja i gubitka apetita. Najopasnija nuspojava, uz intrakranijalno krvarenje, svakako je hipertenzivna kriza, koja može dovesti do fatalnih posljedica. Hrana bogata tiraminom, jednim od aaminskih supstrata MAO enzima, u gastrointestinalnom traktu uključuje zrele sireve, čokoladu i crno vino. Stoga se pojava hipertenzivne krize naziva „*cheese effect*“. Iako je pojavnost takvih incidenata bila relativno rijetka, i zadnji MAOI povučen je s tržišta.⁷³ Osim toga, puno su manje učinkoviti u liječenju depresije u odnosu na tricikličke antidepresive (engl. *tricyclic antidepressants*, TCA) i selektivne inhibitore ponovne pohrane serotonina (engl. *selective serotonin reuptake inhibitor*, SSRI), koji imaju puno bolji farmakoterapijski profil.

Izoforme MAO enzima, MAO A i MAO B, otkrivene su početkom 1970-tih. Za fenomen „*cheese effect*“, uglavnom je odgovorna inhibicija MAO A enzima u gastrointestinalnom traktu,⁷⁴ stoga je prioritet bio razvitak lijekova koji selektivno inhibiraju MAO izoforme, a u slučaju MAO A ta inhibicija mora biti reverzibilna kako bi se izbjegle ozbiljnije nuspojave. Tako je razvijen moklobemid, reverzibilni selektivni inhibitor MAO A. Moklobemid je danas u upotrebi u terapiji rezistentne i atipične depresije. Imao ima mnogo manji rizik za razvoj hipertenzivne krize, ipak se preporučuje izbjegavati konzumaciju hrane bogate tiraminom.

2.5.2. Razvoj selektivnih inhibitora monoamin-oksidaza

Prvi selektivni ireverzibilni MAOI, selegilin (SEL) (Slika 9.),⁷⁵ otkriven je i patentiran 1962. godine od strane mađarskog znanstvenika, Zoltana Ecserija. Ubrzo potom⁷⁶ započeli su biološki pokusi na racematu selegilina te je pokazano da oba enantiomera inhibiraju MAO, ali L-enantiomer ima puno veću učinkovitost.⁷⁷ Stoga su daljnji pokusi provedeni isključivo s L-enantiomerom.



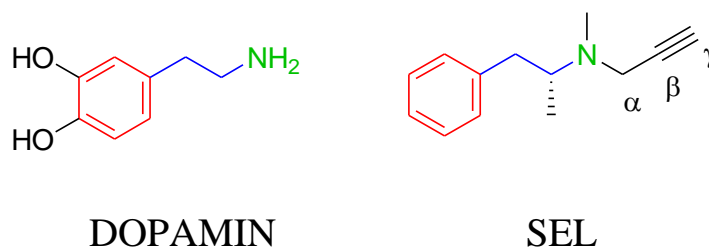
Slika 9. Strukture ireverzibilnih MAO B inhibitora, selegilina (SEL) i razagilina (RAS).

Osim toga, pokazano je da selegilin selektivno inhibira MAO B te je pretpostavka da je mala vjerojatnost da će uzrokovati „*cheese effect*“, najozloglašenu od svih nuspojava MAOI.⁷⁸

Ubrzo nakon toga objavljen je prvi rad o pozitivnom efektu selegilina na bolesnike s Parkinsonovom bolesti.⁷⁹

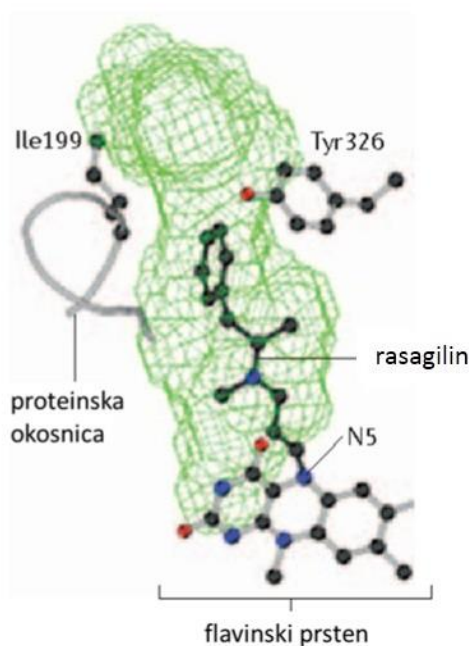
Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) lijek je odobrila 1989. godine, a na tržištu su ga prodavale dvije generičke kompanije, Mylan i Bolan.⁸ Danas je lijek na tržištu u obliku tableta za oralnu primjenu i kao transdermalni flaster.⁸⁰ Oralna bioraspoloživost selegilina je mala i iznosi oko 10 %, a povećava se ako se lijek uzima uz obrok izrazito bogat mastima. Selegilin (i njegovi metaboliti) ekstenzivno se vežu na proteine plazme (94 %) i vrlo lako prijelaze krvno-moždanu barijeru zahvaljujući svojoj visokoj lipofilnosti. U mozgu se lijek koncentrira u nigrostrijatalnom putu; talamusu, bazalnim ganglijama, međumozgu i cingularnom girusu.⁸¹

Selegilin strukturom oponaša kateholamine, prirodne supstrate MAO enzima (Slika 10.). Kao i prirodni supstrati, u svojoj strukturi sadrži aromatsku fenilnu jedinicu, etilni lanac te amino skupinu. Za njegovu aktivnost najbitnija je propargilaminska skupina za koju se smatra da je odgovorna za kovalentno vezanje selegilina za flavinski prsten (Slika 11.).



Slika 10. Usporedba struktura prirodnog supstrata MAO B, dopamina, i ireverzibilnog inhibitora MAO B, selegilina (SEL). Crvenom bojom prikazan je aromatski dio molekule, plavom etilni lanac, a zelenom amino skupina. Propargilaminska skupina u selegilinu obojana je crnom bojom.

U kristalnoj strukturi enzima inhibiranog selegilinom vidljivo je da je konačni produkt inhibicije selegilinom kovalentni adukt u kojem je terminalni C atom propargilaminske skupine vezan za N5 atom u flavinskom prstenu.⁵⁴

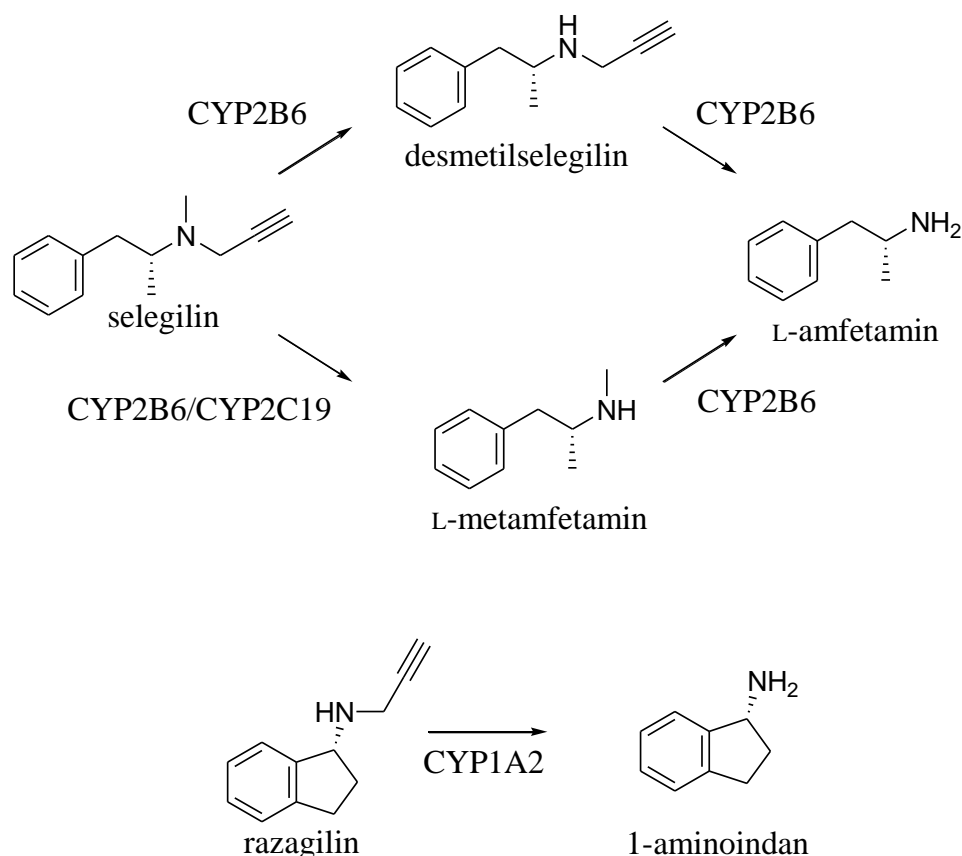


Slika 11. Aktivno mjesto MAO B inhibirano rasagilinom. Slika je preuzeta i prerađena iz reference 61.⁶¹

Glavni mehanizam djelovanja selegilina je povećanje koncentracija dopamina u nigrostrijatalnom putu, kao i smanjenje oksidativnog stresa povezanog s MAO katalizom.⁸² Selektivan je za MAO B, no svoju selektivnost gubi u velikim dozama, pa tako inhibira i MAO A.⁸³

Lijek se metabolizira citokrom P450 (engl. *cytochrome P450*, CYP) superporodicom enzima (Slika 12.), do L-desmetilselegilina i L-metilamfetamina, jednoga od enantiomera metamfetamina.⁸⁴ L-desmetilselegilin inhibira MAO B, no značajno manje u odnosu na selegilin. Za daljnji metabolizam odgovoran je enzim CYP2C19. L-metilamfetamin dalje se metabolizira u L-amfetamin, a hidroksilirani produkti metabolizma selegilina na kraju podliježu glukuronidaciji te se na taj način izlučuju iz organizma. Selegilin je također inhibitor CYP2A6 enzima, što pojačava djelovanje nikotina.⁸⁵

Nuspojave selegilina uglavnom proizlaze iz njegovog djelovanja na adrenergički sustav, bilo samog selegilina ili njegovih metabolita. Također dolazi do inhibicije ponovne pohrane noradrenalina i dopamina. Stoga se može javiti nesanica, ortostatska hipotenzija, hipertenzija, manjak apetita, halucinacije, agitacija i dr.⁸⁶



Slika 12. Metabolizam selegilina i razagilina u ljudskom organizmu.

Nepovoljan profil nuspojava selegilina doveo je do registracije novog ireverzibilnog MAOI, razagilina (RAS) 2005. godine u Europi i sljedeće godine u Sjedinjenim Američkim Državama. Sam spoj u obliku racemata sintetiziran je 35 godina ranije, ali kao ireverzibilni, selektivni MAOI prepoznat je tek 90-tih godina prošlog stoljeća. *R*-enantiomer uskoro je od strane istraživača izraelske farmaceutske kompanije TEVA prepoznat kako aktivni oblik lijeka.⁸⁷

Razagilin (RAS)⁸⁸ je strukturom sličan selegilinu (Slika 9.), no za razliku od njega nije tercijarni, već sekundarni amin te ima nešto rigidniju strukturu zbog 1-aminoindanskog bicikličkog sustava. Dio molekule odgovoran za aktivnost i u ovom slučaju je propargilaminska skupina, koja se, analogno selegilinu, u kristalnoj strukturi inhibiranog enzima nalazi vezana terminalnim C(γ)-atomom na N5-atom u flavinskom prstenu. U skladu s tim, glavni mehanizam djelovanja razagilina identičan je onom selegilina.

Razagilin se metabolizira putem enzima CYP1A2 (Slika 12.), a glavni metabolit mu je 1(*R*)-aminoindan koji nema karakteristike amfetamina⁸⁹ te pokazuje neuroprotektivan učinak na

životinjskim staničnim modelima.⁹⁰ Profil nuspojava sličan je selegilinu, no nuspojave su puno manjeg intenziteta.

Unatoč postojanju komercijalnih inhibitora razagilina i selegilina, zbog rastuće prevalencije neurodegenerativnih bolesti u općoj populaciji, potrebno je razvijati učinkovitije MAOI povoljnijeg farmakoterapijskog profila.

§ 3. TEORIJSKA OSNOVICA RAČUNALNIH METODA

3.1. Osnove kvantne mehanike

3.1.1. Schrödingerova jednačina

Schrödingerovu jednačinu 1925. godine predložio je austrijski fizičar Erwin Schrödinger kao rješenje problema pronalaska valne jednačine koja bi opisivala valove materije.⁹¹ To je jednačina vlastitih vrijednosti; sastoji se od operatora koji djeluje na vlastitu funkciju, što rezultira dobivanjem iste funkcije pomnožene sa skalarom koji predstavlja vlastitu vrijednost tog operatora:

$$\hat{A}\Psi = a\Psi \quad (1)$$

Za svako mjerljivo fizikalno svojstvo nekog sustava postoji pripadni operator koji djelujući na valnu funkciju sustava, kao rezultat daje vlastite vrijednosti, odnosno moguće rezultate mjerenja tog sustava, npr. impuls sile, položaj, kinetičku energiju i dr. Nužan uvjet je da oni uvijek budu linearni hermitski operatori.

Vremenski neovisna Schrödingerova jednačina ima općeniti oblik:

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad (2)$$

u kojem \hat{H} predstavlja Hamiltonov operator (hamiltonijan), koji kao vlastitu vrijednost daje ukupnu energiju sustava E opisanog valnom funkcijom Ψ , koja je ujedno i vlastita funkcija operatora \hat{H} . Hamiltonijan je zbroj operatora kinetičke i potencijalne energije sustava:

$$\hat{H} = \hat{T} + \hat{V} \quad (3)$$

Za jednodimenzionalni problem vremenski neovisna Schrödingerova jednačina ima oblik:

$$\left[-\frac{\hbar^2}{2m} \frac{d^2}{dx^2} + V(x) \right] \Psi(x) = E\Psi(x) \quad (4)$$

dok za tri prostorne dimenzije ima sljedeći oblik:

$$\left[-\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 + V(r) \right] \Psi(r) = E\Psi(r) \quad (5)$$

Prvi član u gore prikazanom hamiltonijanu je operator kinetičke energije, dok drugi predstavlja operator potencijalne energije, r predstavlja poopćenu koordinatu, a ∇ nabla operator (operator parcijalnog deriviranja funkcije po označenoj koordinati; rezultatu deriviranja pridružuje određeni smjer u prostoru) čiji kvadrat predstavlja Laplaceov operator.

Rješenje Schrödingerove jednadžbe je skup valnih funkcija s pripadajućim energijama. Valne funkcije su kompleksne dvostruko derivabilne te kvadratno integrabilne funkcije koje sadrže potpuni opis sustava.

Sama valna funkcija je kompleksna veličina koja nema fizikalnu interpretaciju, dok umnožak kompleksno-konjugirane funkcije njom samom predstavlja gustoću vjerojatnosti nalaženja čestice:

$$\rho(x) \equiv \Psi^*(x)\Psi(x) \quad (6)$$

Nalaženje čestice opisane valnom funkcijom na cijelom prostoru je sigurno, pa se valne funkcije normiraju na jediničnu vrijednost:

$$\int_x \Psi^*(x)\Psi(x) dx = 1 \quad (7)$$

Za određeni sustav postoji više odgovarajućih rješenja ϕ_i , od kojih svaka ima pripadnu vlastitu vrijednost E_i . Te funkcije najčeće su ortonormirane za sustav u kojem valna funkcija ovisi samo o prostornim koordinatama:

$$\int \Psi_i \Psi_j dr = \delta_{ij}, \quad \begin{cases} \delta = 1, i = j \\ \delta = 0, i \neq j \end{cases} \quad (8)$$

3.1.2. Born-Oppenheimerova aproksimacija

Schrödingerova jednadžba može se analitički riješiti samo za atom vodika. Već za sustave s tri ili više subatomske čestice, primjerice molekule H_2^+ ili atom He, nije moguće doći do egzaktnog rješenja. Iz tog razloga potrebno je uvesti aproksimacije kako bi jednadžba bila

popovoljnijeg oblika za numeričko rješavanje u slučaju sustava s više elektrona. Born-Oppenheimerova aproksimacija temelji se na činjenici da su mase jezgara puno veće od mase elektrona, te manje vibriraju i mijenjaju položaj u odnosu na elektrone pri istim uvjetima. Zbog toga se uvodi pretpostavka da su jezgre nepomične u odnosu na elektrone u elektronskom omotaču.⁹² Tako se umjesto rješavanja Schrödingerove jednadžbe za cijelu molekulu odjednom, promatraju elektroni u statičkom potencijalu nepomičnih jezgara. Sada matematički možemo razdvojiti valne funkcije jezgara i elektrona te se ukupna valna funkcija može napisati kao umnožak valnih funkcija za jezgre i valnih funkcija za elektrone:

$$\Psi_{tot}(R, r) = \Psi_N(R)\Psi_e(R, r) \quad (9)$$

gdje R označava ukupnost svih koordinata jezgara, dok r označava ukupnost svih koordinata elektrona. Hamiltonijan za neku molekulu ima oblik:

$$H = T_N + T_e + V(R, r) \quad (10)$$

T_N predstavlja operator kinetičke energije jezgara, T_e operator kinetičke energije elektrona, a $V(R, r)$ operator ukupne potencijalne energije. Schrödingerova jednadžba glasi:

$$(T_N + T_e + V(R, r))\Psi_{tot}(R, r) = E\Psi_{tot}(R, r) \quad (11)$$

$$(T_N + T_e + V(R, r))\Psi_N(R)\Psi_e(R, r) = E\Psi_N(R)\Psi_e(R, r) \quad (12)$$

Budući da valna funkcija ne ovisi o koordinatama elektrona, T_e ne djeluje na nju, a uvodi se i aproksimacija da T_N ne djeluje na elektronsku valnu funkciju. Tada se Schrödingerova jednadžba postavlja u sljedećem obliku:

$$\Psi_e(R, r)T_N\Psi_N(R) + \Psi_N(R)(T_e + V(R, r))\Psi_e(R, r) = E\Psi_N(R)\Psi_e(R, r) \quad (13)$$

kada se ta jednadžba podjeli s $\Psi_N(R)\Psi_e(R, r)$ dobivamo oblik:

$$\frac{T_N\Psi_N(R)}{\Psi_N(R)} + \frac{(T_e + V(R, r))\Psi_e(R, r)}{\Psi_e(R, r)} = E \quad (14)$$

Prvi član, koji opisuje jezgre, ovisi samo o koordinatama jezgara. Sada se Schrödingerova jednačina može razdvojiti na dvije jednačine; jednu koja odgovara elektronima u fiksnom položaju jezgara i drugu za jezgre koje se gibaju pod utjecajem elektronskog potencijala E_e :

$$(T_e + V)\Psi_e = E_e\Psi_e \quad (15)$$

$$(T_N + E_e(R))\Psi_N = E\Psi_N \quad (16)$$

3.1.3. Načelo varijacije

U slučaju analitički nerješive Schrödingerove jednačine, potrebno je koristiti numeričke metode. Neke od njih se temelje na varijacijskom načelu, koje kaže da je očekivana vrijednost energije nekog sustava na bilo koju kvadratno integrabilnu funkciju iz domene hamiltonijana (ne nužno vlastitu funkciju sustava) veća ili jednaka (egzaktnoj tj. vlastitoj) energiji osnovnog stanja tog sustava. Taj teorem nas dovodi u poziciju da odaberemo parametarski zadan skup tzv. testnih funkcija te, varirajući parametre, odredimo onu funkciju iz tog skupa koja daje najnižu očekivanu vrijednost energije, pri čemu je ta vrijednost (po varijacijskom načelu) najbolja procjena energije osnovnog stanja sustava s danim oblikom testne funkcije:

$$\frac{\int \Psi^* \hat{H} \Psi dr}{\int \Psi^* \Psi dr} \geq E_0 \quad (17)$$

Čest oblik testne funkcije korišten u kvantnoj kemiji (a i šire) je tzv. linearna varijacijska funkcija, tj. linearna kombinacija poznatih funkcija:

$$\Psi = \sum_i c_i \phi_i \quad (18)$$

U takvoj funkciji, varijacijski parametri su koeficijenti u linearnoj kombinaciji.

3.1.4. Teorija samousklađenog polja

Temeljna metoda rješavanja elektronske Schrödingerove jednačine je Hartree-Fockova (HF) metoda. To je varijacijska metoda u kojoj se koristi jedna normirana Slaterova determinanta kao testna funkcija. Slaterova determinanta u stupcima sadrži jednoelektronske funkcije (tzv. spin-orbitale), dok se u i -tom retku nalaze spin-orbitale kao funkcije koordinata i -tog elektrona, čime je zagarantirano poštivanje Paulijevog načela isključenja. Slaterova determinanta za slučaj N elektrona izgleda ovako:

$$\Phi_{SD} = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \phi_1(1) & \phi_2(1) & \dots & \phi_N(1) \\ \phi_1(2) & \phi_2(2) & \dots & \phi_N(2) \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ \phi_1(N) & \phi_2(N) & \dots & \phi_N(N) \end{vmatrix}; \langle \phi_i | \phi_j \rangle = \delta_{ij} \quad (19)$$

Varijacijski parametri u ovakvoj testnoj funkciji su upravo spin-orbitale. Cilj je pronaći onaj set spin-orbitala koje će minimizirati očekivanu vrijednost elektronske energije. Ta optimizacija se provodi uz uvjet da su spin-orbitale ortonormirane:

$$\lambda = \langle \Phi_{SD} | H_{el} | \Phi_{SD} \rangle - \sum_{ij} \varepsilon_{ij} (\delta_{ij} - \langle \phi_i | \phi_j \rangle) \quad (20)$$

gdje su ε_{ij} Lagrangeovi multiplikatori. Traženje minimuma ove jednadžbe rezultira HF sustavom jednadžbi:

$$F_i \phi_i = \sum_j^N \varepsilon_{ij} \phi_j \quad (21)$$

gdje F predstavlja Fockov operator. Ovaj sustav nije lako riješiti, međutim njegovo rješavanje postaje lakše ukoliko se prijeđe u bazu jednoelektronskih valnih funkcija koje dijagonaliziraju matricu Lagrangeovih multiplikatora ε , pri čemu gore naveden sustav jednadžbi prelazi u problem vlastitih vrijednosti Fockova operatora:

$$F_i \phi'_i = \varepsilon_i \cdot \phi'_i \quad (22)$$

Pri tome nove jednoelektronske valne funkcije (vlastite funkcije Fockova operatora) nazivamo kanonskim spin-orbitalama, a odgovarajuće vlastite vrijednosti orbitalnim energijama. Uzevši u obzir ukupan elektronski spin osnovnog elektronskog stanja, sustav prikazan gornjom jednadžbom može se integrirati po spinskim koordinatama svih elektrona. Ukoliko se pri tomu pretpostavi da elektroni u parovima dijele isti prostorni dio jednoelektronske funkcije (tzv. ograničavajući pristup, engl. *restricted*), dobivamo sustav:

$$F_i \psi'_i = \varepsilon_i \cdot \psi'_i \quad (23)$$

Gdje su ψ_i kanonske orbitale. Problem ovog sustava je da samo djelovanje Fockovog operatora ovisi o njegovim vlastitim funkcijama. Najjednostavniji način kako aproksimativno riješiti dani sustav je zapisati kanonske orbitale u bazi nekih poznatih (osnovnih) funkcija triju varijabli:

$$\psi_i = \sum_{\alpha}^M C_{\alpha i} \chi_{\alpha} \quad (24)$$

Pri čemu se za osnovne funkcije χ_{α} najčešće koriste atomske orbitale (LCAO pristup).

Hartree-Fockova jednadžba može napisati u sljedećem obliku:

$$F_i \sum_{\alpha}^M C_{\alpha i} \chi_{\alpha} = \varepsilon_i \sum_{\alpha}^M C_{\alpha i} \chi_{\alpha} \quad (25)$$

iz ove jednadžbe dobije se sustav Roothaan-Hallovih jednadžbi za sustave zatvorene ljuske:

$$FC = SC\varepsilon \quad (26)$$

$$F_{\alpha\beta} = \langle \chi_{\alpha} | F | \chi_{\beta} \rangle \quad (27)$$

$$S_{\alpha\beta} = \langle \chi_{\alpha} | \chi_{\beta} \rangle \quad (28)$$

F sadrži elemente Fockove matrice u bazi atomskih orbitala, a S je matrica prekrivanja.

Roothaan-Hallova jednadžba određuje vlastite vrijednosti Fockove matrice. Kako bi se odredili nepoznati koeficijenti $c_{\alpha i}$, Fockovu matricu potrebno je dijagonalizirati. Budući da je matrica poznata kada su poznati svi koeficijenti, postupak počinje dodavanjem pokusnih koeficijenata. Na taj način dobije se Fockova matrica koja se zatim dijagonalizira. Time se dobiva novi skup koeficijenata od kojih se opet konstruira nova Fockova matrica. Ovaj postupak iterativno se ponavlja dok se ne dobiju koeficijenti bliski prethodnima unutar određene granice. Na taj način dobije se N molekularnih orbitala, od toga N popunjenih i $M-N$ nepopunjenih (virtualnih). Virtualne orbitale nemaju fizikalnu interpretaciju, a koriste za procjenu elektronskih afiniteta i opis pobuđenih stanja.

3.2. Elektronska korelacija

Hartree-Fockova (HF) metoda daje rješenja Schrödingerove jednadžbe u kojima su trenutne međuelektronske interakcije zamijenjene prosječnom interakcijom. Ako se koristi veliki osnovni skup, to daje 99 % ukupne energije, no i preostalih 1 % važno je za točan opis kemijskih pojava. Ta razlika naziva se energija elektronske korelacije (EC) i definira se kao razlika između energije dobivene metodom HF uz beskonačan osnovni skup (u praksi nemoguće, pa se pribjegava ekstrapolaciji na beskonačnu bazu i prave (vlastite) elektronske energije. U prosjeku su elektroni međusobno udaljeniji nego što to opisuje HF valna funkcija. Najveći doprinos elektronskoj korelaciji daje Coulombova korelacija među elektronima suprotnog spina, dok nešto manji doprinos daje korelacija između elektrona istog spina. Također, u neposrednoj blizini elektrona smanjena je gustoća vjerojatnosti nalaženja drugog elektrona, pa i ta pojava također doprinosi korelaciji.

HF metoda daje najbolju jednodeterminantnu valnu funkciju i zato sve post-HF metode elektronske korelacije imaju kao početni korak generiranje HF valne funkcije ϕ_{HF} . Na tu valnu funkciju dodaju se nove Slaterove determinante ϕ_i .⁹³

$$\Psi = a_0\phi_{HF} + \sum_i a_i\phi_i \quad (29)$$

Za sustave zatvorene ljuske Roothan-Hallove jednadžbe daju M osnovnih funkcija i N popunjenih spinorbitala, dakle N/2 popunjenih prostornih orbitala. Zamjenom zauzetih molekulskih orbitala s nezauzetima stvara se niz novih Slaterovih determinanti. Pobuđenje može biti jednostruko, dvostruko, trostruko ili višestruko, ovisno o tome koliko je zauzetih molekulskih orbitala zamijenjeno nezauzetima. Koliko ukupno determinanti može biti dodano, ovisi o veličini odabranog osnovnog skupa. Ako su u pobudu uključene sve moguće determinante, sva je korelacija za taj skup uključena, a korištenjem još i potpunog baznog skupa (neograničen), dobiva se „točno“ rješenje. No treba imati na umu da je i to samo približno rješenje, više ili manje različito od eksperimentalne vrijednosti zbog primjene Born-Oppenheimerove aproksimacije zbog zanemarivanja relativističkih efekata.

Kako se važne kemijske promjene događaju uglavnom u valentnim orbitalama, korelacija se često računa samo za valentne elektrone, što se naziva aproksimacija zamrznutih unutarnjih orbitala (engl. *frozen core*, FC). Ova aproksimacija nije dobra za računanje ukupne

energije sustava jer je korelacija značajna i za unutarnje elektrone, ali isto tako, ona je u unutarnjim orbitalama slična za slične sustave pa se pogreška poništi prilikom računanja njihovih relativnih energija. Često se isključuju i najviše virtualne orbitale koje pripadaju protuveznim orbitalama, što se naziva aproksimacija zamrznutim virtualnim orbitalama.

Tri su osnovne skupine post-HF metoda elektronske korelacije: konfiguracijska interakcija (engl. *configuration interaction*, CI), Moller-Pleset perturbacijska teorija (MPn metode) i metoda spregnutih grozdova (engl. *Coupled Cluster*, CC). O ovim metodama nadalje neće biti riječi jer nisu korištene za izradu ovog rada.

3.3. Teorija funkcionala gustoće

Teorija funkcionala gustoće (engl. *Density Functional Theory*, DFT) temeljena je na Hohenberg-Kohnovom teoremima. Prema prvom teoremu, elektronska energija osnovnog stanja molekule u potpunosti je određena njenom elektronskom gustoćom koja ovisi o tri prostorne koordinate neovisno o veličini sustava. Na taj se način problem računanja molekule od N elektrona s $3N$ pripadnih prostornih koordinata (ili $4N$ ako je uključena i ona spinska), svodi na problem s tri prostorne koordinate. Oblik funkcionala koji povezuje energiju osnovnog stanja i elektronsku gustoću nije poznat. Upravo DFT metodama pokušava se pronaći oblik funkcionala elektronske gustoće u prostoru pomoću kojeg bi se izračunala elektronska energija molekule.

Međutim, čak i kada bismo imali egzaktni $E[\rho]$, bez eksperimentalnih podataka ne bismo znali ρ . Tu nam uvelike pomaže drugi Hohenberg-Kohnovom teorem, koji kaže da je egzaktna elektronska gustoća ona koja minimizira elektronsku energiju sustava. To znači da bismo trebali minimizirati $E[\rho]$ te dobiveni ρ koristiti za dobivanje egzaktna elektronske energije.

Funkcional gustoće možemo podijeliti na tri dijela: kinetičku energiju $T[\rho]$, privlačenje elektrona i jezgara $E_{ne}[\rho]$ i međuelektronsko odbijanje $E_{ee}[\rho]$. Unutar Born-Oppenheimerove aproksimacije odbijanje među jezgrama je konstantno. $E_{ee}[\rho]$ može se podijeliti na Coulombov dio $J[\rho]$ i izmjenski dio $K[\rho]$, a korelacijska energija je implicitno uključena u oba izraza. Poznati su klasični oblici $E_{ne}[\rho]$ i $J[\rho]$:

$$E[\rho] = T[\rho] + E_{ne}[\rho] + E_{nn}[\rho] \quad (30)$$

$$E_{ee}(\rho) = J[\rho] + K[\rho] \quad (31)$$

$$E_{ne}[\rho] = \sum_a \int \frac{Z_a \rho(r)}{|R_a - r|} dr \quad (32)$$

$$J[\rho] = \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r) - \rho(r')}{|r - r'|} dr dr' \quad (33)$$

Za kinetičku energiju i energiju izmjene prvo se koristio model neinteragirajućeg homogenog elektronskog plina (teorija Thomasa, Fermija i Diraca):

$$T_{TF}[\rho] = C_F \int \rho^{\frac{5}{3}}(r) dr \quad (34)$$

$$C_F = \frac{3}{10} \left(3\pi^{\frac{2}{3}} \right) \quad (35)$$

$$K_D[\rho] = -C_x \int \rho^{\frac{4}{3}}(x) dr \quad (36)$$

$$C_x = \frac{3}{4} \left(\frac{3}{\pi} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (37)$$

Ovaj model davao je vrlo loše rezultate pa tako, na primjer, uopće nije predviđao povezivanje atoma u molekule.

Tek kada su uvedene Kohn-Shamove orbitale, DFT metode počele su davati upotrebljive rezultate. Kohn i Sham uveli su zamisao da se funkcional kinetičke energije podijeli u dva dijela; jedan koji se može točno izračunati, a drugi koji predstavlja korekciju. Postavlja se hamiltonijan:

$$H_\lambda = T + V_{ext} + \lambda E_{ee} \quad (38)$$

V_{ext} je vanjski potencijal, a parametar λ može biti između 0 i 1. Kada on iznosi 1, $V_{ext} = V_{ne}$. Za slučaj $\lambda = 0$, radi se o hipotetskom sustavu u kojem nema međuelektronskih djelovanja. U

tom slučaju točno rješenje Schrödingerove jednadžbe s H_λ je Slaterova determinanta koja se sastoji od molekulskih orbitala ϕ_i , pomoću kojih se može definirati funkcional kinetičke energije:

$$T_s = \sum_{i=1}^N \left\langle \phi_i \left| -\frac{1}{2} \nabla^2 \right| \phi_i \right\rangle \quad (39)$$

Kinetička energija se računa iz prirodnih orbitala i točne matrice gustoće:

$$T[\rho_{exact}] = \sum_{i=1}^{\infty} n_i \left\langle \phi_i^{NO} \left| -\frac{1}{2} \nabla^2 \right| \phi_i^{NO} \right\rangle \quad (40)$$

$$\rho_{exact} = \sum_{i=1}^{\infty} n_i |\phi_i^{NO}|^2 \quad (41)$$

$$N = \sum_{i=1}^{\infty} n_i \quad (42)$$

n_i predstavlja orbitalne okupacijske brojeve i vlastite vrijednosti matrice gustoće, a ima vrijednost između 0 i 1. Budući da točna matrica gustoće nije poznata, koristi se izraz za približnu elektronsku gustoću kao skup pomoćnih jednoelektronskih Kohn-Shamovih orbitala:

$$\rho(r) = \sum_{i=1}^N |\phi_i(r)|^2 \quad (43)$$

Ideja Kohn-Shamove teorije je izračunati kinetičku energiju pod pretpostavkom neinteragirajućih elektrona, dok se razlika između točne kinetičke energije i one izračunate, pod

tom pretpostavkom, uključuje u izmjensko-korelacijski član. Tada se elektronska energija može prikazati kao zbroj pojedinačnih doprinosa:

$$E_{DFT} = T_S[\rho] + E_{ne}[\rho] + J[\rho] + E_{XC}[\rho] \quad (44)$$

U jednadžbi (44) $E_{XC}[\rho]$ predstavlja izmjensko-korelacijski član te uključuje sve doprinose koji nisu sadržani u ostala tri člana. Pod pretpostavkom da je $E = E_{DFT}$, dobivamo sljedeći izraz za izmjensko-korelacijski član:

$$E_{XC} = (T[\rho] - T_S[\rho]) + (E_{ee}[\rho] - J[\rho]) \quad (45)$$

Izraz u prvoj zagradi predstavlja kinetičku korelacijsku energiju, dok izraz u drugoj zagradi označava izmjensku i potencijalnu korelacijsku energiju. E_{XC} se uobičajeno dijeli na dva dijela: energiju korelacije E_C i energiju izmjene E_X :

$$E_{XC} = E_X[\rho] + E_C[\rho] = \int \rho(r)\varepsilon_x[\rho(r)] dr + \int \rho(r)\varepsilon_c[\rho(r)] dr \quad (46)$$

gdje ε_x (odnosno ε_c) predstavlja energiju izmjene (odnosno korelacije) po elektronu u homogenom elektronskom plinu konstantne gustoće. Izmjensko-korelacijskom članu značajno više doprinosi energija izmjene od energije korelacije.

Funkcional gustoće za prva tri člana u jednadžbi (44) je poznat, a problem se svodi na pronalaženje funkcionala koji povezuje elektronsku gustoću i izmjensko-korelacijski član. Ako bi bio poznat točan izraz, takva DFT metoda dala bi (variranjem energije s obzirom na gustoću, prema Hohenberg-Kohnovom drugom teoremu) egzaktnu elektronsku gustoću, te iz nje i egzaktnu ukupnu energiju. Velika prednost približnih DFT metoda leži u tome što se približni izmjensko-korelacijski funkcionali vrlo lako računaju, tj. nisu toliko računalno zahtjevni. DFT metode međusobno se razlikuju po obliku funkcionala izmjensko-korelacijske energije.

3.3.1. Metode lokalne gustoće

Metode lokalne gustoće (engl. *Local Density Approximation*, LDA) pretpostavljaju da gustoću možemo lokalno tretirati kao jednolični elektronski plin, tj. da je ona sporomijenjajuća funkcija. Za opis energije izmjene jednoličnog plina koristi se Diracova formula:

$$E_X^{LDA}[\rho] = -C_X \int \rho^{\frac{4}{3}}(r) dr \quad (47)$$

$$\varepsilon_X^{LDA}[\rho] = -C_X \rho^{\frac{1}{3}} \quad (48)$$

Gdje C_X predstavlja konstantu $C_X = -\frac{3}{4} \left(\frac{3}{\pi}\right)^{\frac{1}{3}}$. U općenitijem slučaju gustoće α i β spinova nisu jednake pa se koristi aproksimacija lokalne spinske gustoće (engl. *Local Spin Density Approximation*, LSDA):

$$E_X^{LSDA}[\rho] = -2^{\frac{1}{3}} C_X \int \left(\rho_\alpha^{\frac{4}{3}} + \rho_\beta^{\frac{4}{3}} \right) dr \quad (49)$$

$$\varepsilon_X^{LSDA}[\rho] = -2^{\frac{1}{3}} C_X \left(\rho_\alpha^{\frac{1}{3}} + \rho_\beta^{\frac{1}{3}} \right) \quad (50)$$

Gornji izraz možemo napisati i u obliku ukupne gustoće i spinske polarizacije:

$$\varepsilon_X^{LSDA}[\rho] = -\frac{1}{2} C_X \rho^{\frac{1}{3}} \left[(1 + \zeta)^{\frac{4}{3}} + (1 - \zeta)^{\frac{4}{3}} \right] \quad (51)$$

gdje ζ označava spinsku polarizaciju. Kod sustava zatvorene ljuske LDA je istovjetna LSDA. Korelacijska energija jednoličnog elektronskog plina određena je Monte Carlo metodama za mnoge gustoće, a kako bi se ti rezultati koristili u DFT metodama, treba imati odgovarajuću analitičku funkciju. Takvu funkciju razvili su Vosko, Wilk i Nusair⁹⁴ te ona radi interpolaciju između nepolarizirane ($\zeta = 0$) i polarizirane elektronske gustoće ($\zeta = 1$):

$$\varepsilon_c^{VWN}[r_s, \zeta] = \varepsilon_c(r_s, 0) + \varepsilon_a r_s \left[\frac{f(\zeta)}{f''(0)} \right] [1 - \zeta^4] + [\varepsilon_c(r_s, 1) - \varepsilon_c(r_s, 0)] f(\zeta) \zeta^4 \quad (52)$$

$$f(\zeta) = \frac{(1 + \zeta)^{\frac{4}{3}} + (1 - \zeta)^{\frac{4}{3}} - 2}{2 \left(2^{\frac{1}{3}} - 1 \right)} \quad (53)$$

gdje $\varepsilon_c(r_s, 0)$ predstavlja korelacijski član kada nema, odnosno ima polarizacije elektronske gustoće ($\varepsilon_c(r_s, 1)$), a r_s parametar elektronskog plina. Modificirani oblik dali su Perdew i Wang i on se koristi kao funkcional PW91:

$$\varepsilon_{c/a}^{PW91}[x] = -2\alpha\rho(1 - \alpha x^2)\ln\left(1 + \frac{1}{2\alpha(\beta_1 x + \beta_2 x^2 + \beta_3 x^3 + \beta_4 x^4)}\right) \quad (54)$$

Tu je x bezdimenzijska varijabla gradijenta a α i β su konstante dobivene na temelju eksperimentalnih podataka.

LSDA obično podcjenjuje energiju izmjene za oko 10 % te precjenjuje korelaciju, zato su jačine veza koje računa prevelike. Stoga, LSDA metode daju rezultate usporedive s HF metodama.⁹⁵

3.3.2. Metode poboljšane gradijentom

U metodama poboljšanim gradijentom gustoću energije korelacije i izmjene ovise ne samo o lokalnoj elektronskoj gustoći, već i o njezinoj prvoj derivaciji. To još nazivamo i poopćenom gradijentnom aproksimacijom (engl. *Generalized Gradient Approximation*, GGA)

Perdew i Wang predložili su izraz za energiju izmjene PW86:

$$\varepsilon_x^{PW86} = \varepsilon_x^{LDA}(1 + ax^2 + bx^3 + cx^4) \quad (55)$$

$$x = \frac{(\nabla\rho)}{\rho^{\frac{4}{3}}} \quad (56)$$

Tu je x bezdimenzijska varijabla gradijenta, a a , b i c su konstante.

Becke je predložio izraz za korekciju energije izmjene po LSDA, poznat pod oznakama B88 ili samo B:

$$\varepsilon_x^{B88} = \varepsilon_x^{LSDA} + \Delta\varepsilon_x^{B88} \quad (57)$$

$$\Delta\varepsilon_x^{B88} = -\beta\rho^{\frac{1}{3}}\frac{x^2}{1 + 6\beta\sinh^{-1}x} \quad (58)$$

β je parametar koji je određen iz podataka za atome, a x je jednak onom u jednadžbi (58).

Lee, Yang i Parr predložili su poznati funkcional energije korelacije LYP:

$$\begin{aligned} \varepsilon_c^{LYP} = & -a \frac{\gamma}{1 + d\rho^{-\frac{1}{3}}} \\ & + ab \frac{\gamma e^{-c\rho^{-\frac{1}{3}}}}{9 \left(1 + d\rho^{-\frac{1}{3}}\right) \rho^{\frac{8}{3}}} \left[18 \left(2^{\frac{2}{3}}\right) C_F \left(\rho_\alpha^{\frac{8}{9}} + \rho_\beta^{\frac{8}{3}}\right) \right. \\ & \left. - 18\rho t_w + \rho_\alpha (2t_w^\alpha + \nabla^2 \rho^\alpha) + \rho_\beta (2t_w^\beta + \nabla^2 \rho^\beta) \right] \end{aligned} \quad (59)$$

gdje je

$$\gamma = 2 \left(1 + \frac{\rho_\alpha^2 + \rho_\beta^2}{\rho^2} \right) \quad (60)$$

$$t_w = \frac{1}{8} \left(\frac{|\nabla \rho|^2}{\rho} - \nabla^2 \rho \right) \quad (61)$$

dok su a , b , c i d parametri određeni iz podataka za atom helija.

Funkcional izmjene B88 često se koristi u kombinaciji s funkcionalima korelacije u koje je također uključen gradijent elektronske gustoće. Od takvih najpoznatiji su B-LYP^{96,97} (funkcional B u kombinaciji s funkcionalom kojeg su razvili Lee, Yang i Parr), te B-PW (B funkcional u kombinaciji s funkcionalom koji su razvili Perdew i Wang).⁹⁸

Kako bi se dobio izraz za energiju korelacije i izmjene, moguće je interpolirati izraz za izmjensko korelacijski član za sustav neovisnih elektrona s izrazom za sustav interagirajućih elektrona. Hartree-Fockova teorija, sadrži egzaktnu energiju izmjene za elektrone koji ne ulaze u interakciju. Najčešće je korišten B3-LYP,⁹⁹ Beckeov model s tri parametra koji u sebi sadrži i korekciju na gradijent gustoće LYP. Izraz glasi:

$$E_{XC}^{B3-LYP} = (1 - \alpha) E_X^{LSDA} + \alpha E_X^{HF} + b E_X^{AB} + (1 - c) E_C^{VWN} + c E_C^{LYP} \quad (62)$$

Parametri $a = 0,8$, $b = 0,72$ i $c = 0,81$ dobiveni su na temelju eksperimentalnih podataka. B3-LYP znatno je bolji od B-LYP metode, a daje gotovo jednako točne rezultate kao perturbacijske MP metode uz utrošak vremena kao HF. Neki od poznatijih korelacijskih GGA funkcionala su: PW86, PW91,¹⁰⁰ PBE0PBE^{101,102} itd.

3.3.3. Metode poboljšane gustoćom kinetičke energije

Daljnja nadogradnja na GGA metode su one u kojima energije korelacije i izmjene ovise (osim o elektronskoj gustoći i njenom gradijentu) i o drugoj derivaciji elektronske gustoće (Laplacianu), a u praksi i o gustoći neinteragirajuće kinetičke energije, jer je numerički stabilnija. To još nazivamo i meta-poopćenom gradijentnom aproksimacijom (engl. *Meta Generalized Gradient Approximation*, meta-GGA). Dio funkcionala neovisan o spinu tada glasi:

$$E_{XC}^{MGGGA}[\rho] = \int dr \rho(r) \varepsilon_{XC}(\rho(r), \nabla \rho(r), \tau(r)) \quad (63)$$

gdje je $\tau(r)$ gustoća neinteragirajuće kinetičke energije definirane kao:

$$\tau(r) = \frac{1}{2} \sum_i^k |\nabla \phi_i(r)|^2 \quad (64)$$

gdje su $\phi_i(r)$ Kohn-Shamove orbitale određene SCF procedurom, a k broj okupiranih orbitala. Razvijen je velik broj meta-GGA funkcionala uključujući B95¹⁰³, B98, ISM, KCIS¹⁰⁴, PKZB^{105,106}, τ HCTH,¹⁰⁷ TPSS,¹⁰⁸ i VSXC.¹⁰⁹ Komputacijska zahtjevnost ovih metoda u potpunosti je usporediva s GGA metodama i tu je moguće uključiti HF izmjenu kako bi se dobili točniji rezultati.

U izradi ove doktorske disertacije korištena je grupa tzv. Minnesota funkcionala, visoko parametriziranih funkcionala baziranih na meta-GGA aproksimaciji. Razvijeni su u grupi profesora Donalda Truhlara na Sveučilištu u Minnesoti. Ovi funkcionali uključuju članove koji ovise o gustoći kinetičke energije i svi su parametrizirani na eksperimentalne podatke iz visokokvalitetnih baza podataka. Minnesota funkcionali pokazuju jako dobre performanse na klasičnim organskim sustavima, stoga se često koriste. Prva porodica Minnesota funkcionala, objavljena 2005. godine, uključuje dva funkcionala, M05¹¹⁰ i M05-2X,¹¹¹ koji uključuju 28 %, odnosno 56 % HF izmjene te 22 dodatna empirijska parametra. 2006. godine razvijena je M06

porodica funkcionala, koja uključuje pet novih funkcionala. M06 i M06-2X¹¹² uvode 35, odnosno 32 empirijska parametara u izmjensko-korelacijski član. M06-2X pokazao se prikladnim za opis reakcija u aktivnom mjestu MAO enzima,⁹ stoga je izabran kao metoda u izradi ove doktorske disertacije.

3.4. Skupovi osnovnih funkcija

Osnovnim skupom nazivamo bazu vektorskog prostora u kojoj se zapisuju molekulske orbitale. Potpuni opis valne funkcije zahtijeva beskonačan skup osnovnih funkcija, što je računski nedostupno. Odabirom baznog skupa valna funkcija se opisuje s konačnim brojem osnovnih funkcija. Što je veći broj osnovnih funkcija koje opisuju valnu funkciju, to je uglavnom točniji opis molekulskih orbitala. Za optimalnu efektivnost potrebno je odabrati skup osnovnih funkcija na način da se što lakše računaju, a da se točnost računa bitno ne naruši.

3.4.1. Orbitale Slaterovog i Gaussovog tipa

Dva tipa osnovnih funkcija koriste se u računima: orbitale Slaterovog tipa (engl. *Slater type orbitals*, STO) i orbitale Gaussovog tipa (engl. *Gauss type orbitals*, GTO). Nazivaju se i atomskim orbitalama iako nisu rješenja Schrödingerove jednačbe za atome.⁹¹

Matematički oblik orbitale Slaterovog tipa glasi:

$$\chi_{\zeta,n,l,m}(r, \vartheta, \varphi) = Nr^{n-1}e^{-\zeta r}Y_{l,m}(\vartheta, \varphi) \quad (65)$$

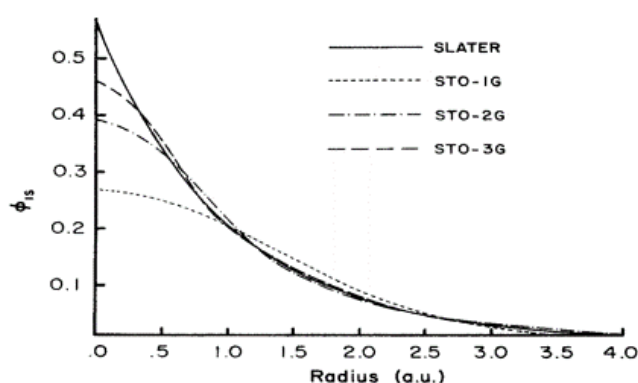
Gdje je ζ eksponent, n glavni kvantni broj, l angularni kvantni broj, m magnetni kvantni broj, a r, ϑ, φ su sferne koordinate, dok je N konstanta normiranja. STO orbitale u početku su korištene zbog svoje sličnosti s atomskim orbitalama vodikova atoma, no nemaju radijalne čvorove, pa se njih treba uvesti linearnim kombinacijama STO orbitala. Kako raste broj osnovnih funkcija, linearna kombinacija konvergira prema točnom obliku molekulske orbitale, no trocentrični i četverocentrični dvoelektronski integrali ne mogu se računati analitički. STO se stoga koriste u jednoatomnim i dvoatomnim sustavima gdje je potrebna velika točnost kao i u semiempirijskim računima gdje su takvi integrali zanemareni.

Orbitale Gaussovog tipa mogu se prikazati i u polarnim i u Kartezijevim koordinatama:

$$\chi_{\zeta,n,l,m}(r, \vartheta, \varphi) = NY_{l,m}(\vartheta, \varphi)r^{(2n-2-l)}e^{-\zeta r^2} \quad (66)$$

$$\chi_{\zeta, l_x, l_y, l_z}(x, y, z) = N x^{l_x} y^{l_y} z^{l_z} e^{-\zeta r^2} \quad (67)$$

gdje je ζ eksponent, N konstanta normiranja, x , y , i z predstavljaju Cartezijeve koordinate, dok su l_x , l_y i l_z eksponenti te njihov broj određuje o kojem tipu orbitale se radi (npr. $l_x + l_y + l_z = 1$ predstavlja p orbitalu). GTO su ovisne o kvadratu udaljenosti elektrona od jezgre (u eksponencijalnom članu), što ih čini lošijima od STO. GTO slabije opisuju ponašanje elektrona blizu jezgre (na jezgri GTO imaju derivaciju 0, dok STO imaju prekid u obliku šiljka, tj. uopće nemaju derivaciju), a i na velikim udaljenostima od jezgre GTO prebrzo opada. Stoga je potrebno upotrijebiti oko tri puta veći broj GTO u linearnoj kombinaciji kako bi se postigla ista razina točnosti kao STO (Slika 13.). Veliko povećanje broja osnovnih funkcija kod GTO praćeno je puno lakšim računanjem integrala, stoga se GTO u praksi puno više koriste.



Slika 13. Reprezentacija orbitala Slaterovog tipa orbitalama Gaussovog tipa. Slika je preuzeta iz reference 91.⁹¹

Broj osnovnih funkcija najvažniji je faktor koji određuje točnost računa. Minimalni osnovni skup sadrži najmanji broj osnovnih funkcija koji je potreban da se opišu svi elektroni u sustavu. Osnovni skup možemo poboljšati tako da udvostručimo broj osnovnih funkcija stvarajući dvostruke ζ (engl. *Double Zeta*, DZ). Takav skup koristi po dvije funkcije za opis atoma vodika ($1s$ i $1s'$), za elemente druge periode četiri s -funkcije i dvije p -funkcije ($1s$, $1s'$, $2s$, $2s'$, $2p$, $2p'$) itd. Također, broj osnovnih funkcija možemo utrostručiti (engl. *Triple Zeta*, TZ), učeterostručiti (engl. *Quadruple Zeta*, QZ) itd.

Polarizacijske funkcije, funkcije s većim angularnim momentom, važne su za bolji opis sustava. Ako se na s orbitalu dodaju p orbitale, one omogućuju opis polarizacije na s orbitali.

Jednako se koriste d orbitale za polarizaciju p orbitala, f za polarizaciju d , a također se može na p orbitalu dodanu na s orbitalu dodati još jedna d orbitala, itd. Polarizacija je posebno bitna za opis sustava u kojima postoji hibridizacija, prijelazna stanja, itd. Za jednodeterminantne valne funkcije u kojima se ne uzima u obzir elektronska korelacija, prvi skup polarizacijskih funkcija najvažniji je i opisuje glavne učinke polarizacije. DZP (engl. *Double Zeta plus Polarization*) osnovni skup ima jedan skup polarizacijskih funkcija dodan na početne funkcije iz DZ skupa (p funkcije na vodike i d funkcije na teške atome). Skup TZ2P (engl. *Triple Zeta plus Double Polarization*) ima po dva skupa polarizacijskih funkcija dodan na TZ skup. Rezultati dobiveni HF metodom ne poboljšavaju se značajno korištenjem skupa osnovnih funkcija većeg od TZ2P jer se rezultati približavaju HF graničnim vrijednostima, dok metode koje uključuju korelaciju trebaju veće skupove osnovnih funkcija s više polarizacijskih funkcija za istu razinu konvergencije energije.

Potrebno je da skup osnovnih funkcija bude uravnotežen, tj. da se ne dodaje previše polarizacijskih funkcija na premali skup iz razloga što će optimizacijska procedura pokušati nadoknaditi nedovoljni osnovni skup korištenjem funkcija većeg angularnog momenta. EkspONENTI za s i p funkcije određuju se metodom HF za atome, koristeći ih kao varijacijske parametre. Na taj se način ne mogu odrediti eksponenti za polarizacijske funkcije jer u atomima nema polarizacije, pa se određuju varijacijskim HF računom za molekulske sustave (gdje energija ovisi i o polarizacijskim funkcijama).

Skupovi osnovnih funkcija optimirane energije uglavnom ovise o valnoj funkciji u području unutarnjih elektrona. Na primjeru ugljikovog atoma, elektroni u $1s$ orbitali daju velik udio ukupne energije, pa će minimiziranje dati optimalni skup osnovnih funkcija za unutarnje elektrone te manje optimalan za vanjske. Kako kemijske promjene uglavnom ovise o vanjskim, valentnim elektronima, kao i mnoga druga svojstva (npr. polarizabilnost), optimirani skupovi koriste i difuzne funkcije (osnovne funkcije malog eksponenta ζ) kada postoje elektroni koji su jako udaljeni od jezgre (anioni, pobuđena stanja) ili kada se računa svojstvo koje jako ovisi o vanjskom dijelu funkcije (poput polarizabilnosti).

Optimizacijom s obzirom na energiju, kemijski važan dio sustava, valentni elektroni, opisani su malim brojem osnovnih funkcija, dok najveći dio otpada na opis unutarnjih elektrona, koji su kemijski manje važni i uglavnom konstantni. Ako se varijacijski koeficijenti ispred osnovnih funkcija za unutarnje elektrone učine konstantnima, nije ih potrebno ponovno varijacijski određivati. Kontrakcija je kombiniranje punog skupa osnovnih funkcija

(primitivnih GTO ili PGTO) korištenjem fiksiranih linearnih kombinacija, a rezultatne funkcije se nazivaju kontrahirane GTO (CGTO):

$$\chi(\text{CGTO}) = \sum_i^k a_i \chi_i(\text{PGTO}) \quad (68)$$

Kontraksije su osobito korisne za unutarnje elektrone koji zahtijevaju veliki broj funkcija za opis ponašanja elektrona blizu jezgre, a uglavnom su neovisne o okruženju. Smanjenjem varijacijskih parametara, bitno smanjuje i trajanje računa. Stupanj kontraksije predstavlja broj PGTO koje ulaze u CGTO i obično je između 1 i 10. Postoje dva načina kontraksije, segmentirana i opća. Kod segmentirane, dani skup PGTO podijeljen je u manje skupove funkcija koje čine CGTO. Npr. skup od 10 s orbitala može biti sažet u tri skupa, šest unutarnjih orbitala čine jedan CGTO, iduće tri čine drugi CGTO, a zadnja čini treći CGTO:

$$\chi_1(\text{CGTO}) = \sum_{i=1}^6 a_i \chi_i(\text{PGTO}) \quad (69)$$

$$\chi_2(\text{CGTO}) = \sum_{i=7}^9 b_i \chi_i(\text{PGTO}) \quad (70)$$

$$\chi_3(\text{CGTO}) = \chi_{10}(\text{PGTO}) \quad (71)$$

Opća kontraksija radi se tako da sve PGTO određenog atoma i odgovarajućeg angularnog momenta ulaze u sve CGTO koje imaju taj angularni moment, ali s drugim koeficijentima:

$$\chi_1(\text{CGTO}) = \sum_{i=1}^{10} a_i \chi_i(\text{PGTO}) \quad (72)$$

$$\chi_2(\text{CGTO}) = \sum_{i=1}^{10} b_i \chi_i(\text{PGTO}) \quad (73)$$

$$\chi_3(CGTO) = \sum_{i=1}^{10} c_i \chi_i(PGTO) \quad (74)$$

Postoji više vrsta skupova osnovnih funkcija: Popleovi skupovi,¹¹³ Dunning-Huzinagini skupovi,¹¹⁴ skupovi MINI,¹¹⁵ MIDI¹¹⁶ i MAXI⁹³, skupovi prirodnih atomskih orbitala (ANO),¹¹⁷ skupovi usklađeni s obzirom na korelaciju (engl. *Correlation Consistent*¹¹⁴). Najčešće korišteni skupovi osnovnih funkcija, kao i oni korišteni u izradi ove disertacije su Popleovi osnovni skupovi.

3.4.2. Popleovi skupovi osnovnih funkcija

Prva skupina Popleovih osnovnih skupova je STO- n G,¹¹³ tj. kontrakcija STO koja je prikazana n PGTO-ima. Postoje skupovi u kojima je n od 2 do 6, no pokazalo se da se kombinacijom više od 3 PGTO ne dobiva značajno poboljšanje, pa je iz tog razloga najčešće korišten STO-3G.

Druga vrsta skupova je k - nlm G. To su skupovi s posebnom reprezentacijom valentnih orbitala (engl. *split valence*). Tu k označava broj PGTO korištenih za opis unutarnjih orbitala. Drugi dio, nlm , označava koliko je CGTO korišteno za opis valentnih orbitala, te koliko je PGTO korišteno u svakoj CGTO. Tako nl označava dvostruko podijeljene valentne orbitale, a nlm trostruko podijeljene.

Najjednostavniji primjer takvog skupa je 3-21G, gdje su unutarnji elektroni opisani kontrakcijom od po tri PGTO, unutarnji dio valentnih orbitala opisan je kontrakcijom od dvije PGTO, a vanjski dio jednom PGTO. Kod skupa 6-31G, unutarnji elektroni opisani su sa šest PGTO, a vanjski s tri PGTO i jednom PGTO. Kod 6-311 svaka valentna orbitala je opisana s tri kontrakcije s različitim eksponentima.

Na svaki od tih skupova mogu se dodati polarizacijske i difuzne funkcije. Polarizacijske funkcije označavaju se nakon slova G, pa tako postoji 6-31G(d) kod kojeg je jedan skup d -funkcija dodan na svaki teški atom. Kod skupa 6-31G(d,p) dodana je po jedna d orbitala na svaki teški atom i po jedna p orbitala na svaki vodikov atom. Kod 6-311G(2df,2pd), na svaki teški atom dodana je kontrakcija od dvije d orbitale i jedne f orbitale, a na vodike kontrakcija od dvije p orbitale i jedne d orbitale.

Difuzne funkcije obično su s - i p -tipa. Oznaka plus u imenu znači da je dodan skup s -difuznih funkcija i p -funkcija na teške atome, a ++ znači da je na teške atome dodan skup difuznih s - i p -funkcija, a na vodikove atome skup difuznih s -funkcija.

3.5. Solvatacijski efekti

Glavnina organskih i enzimskih reakcija događa se u otopini. Kako bi se opisali solvatacijski efekti, nužno je izračunati interakciju otapala i otopljene tvari (proučavanog sustava). Otapalo utječe i na energiju i na geometriju sustava, pa je odabir dobrog solvatacijskog modela i načina izračuna solvatacije ključan u ispravnom opisu kemijskog sustava. Osim toga, otapalo vrlo često sudjeluje u samom mehanizmu reakcije.^{118–120} Najčešće korišteni pristupi su implicitna te eksplicitna solvatacija, odnosno kombinacija oba pristupa (tzv. supramolekularni pristup).

Implicitna solvatacija podrazumijeva model polarizabilnog kontinuuma. Proces solvatacije u ovim modelima promatra se kao niz sljedećih procesa: nastanak solvatacijske šupljine u polarizabilnom kontinuumu, ulazak promatrane molekule u „nastalu“ šupljinu i relaksacija kontinuuma oko molekule. Postoje različiti modeli implicitne solvatacije, među kojima su korišteniji PCM, CPCM¹²¹, COSMO¹²² i SMD¹²³ modeli. Implicitna solvatacija može se koristiti pri geometrijskoj optimizaciji ili pri izračunu Gibbsove energije solvatacije (solvatacijski efekt na geometriji dobivenoj optimizacijom u plinskoj fazi).

Osnovne prednosti implicitnih modela u odnosu na eksplicitne su mali utjecaj na zahtjevnost računa i mogućnost oslanjanja na parametrizaciju prema eksperimentalnim parametrima. Isto tako, rezultate dobivene različitim implicitnim modelima lako je uspoređivati. Ta tri faktora omogućila su vrlo brzi porast u kvaliteti i broju dostupnih implicitnih modela. Implicitni modeli, u pravilu, kao rezultat daje standardnu Gibbsovu energiju solvatacije. Ta se energija zatim pribraja (Gibbsovoj) energiji soluta u plinskoj fazi, iz čega se dobiva (Gibbsova) energija u otopini. Računi energije solvatacije ne moraju biti provedeni na istoj razini teorije kao npr. i računi geometrijske optimizacije u plinskoj fazi.

Uobičajeno se geometrijska optimizacija u implicitnom otapalu provodi zbog usporedbe struktura dobivenih geometrijskom optimizacijom u vakuumu i modelnom otapalu. Ako se strukture ne razlikuju značajno, izračun Gibbsove slobodne energije solvatacije provodi se na strukturi dobivenoj geometrijskom optimizacijom bez implicitnog otapala.

Osnovni parametri koji su potrebni za (C)PCM račune su: modelno otapalo s poznatom dielektričnom konstantom (ϵ), elektrostatički korekcijski faktor (α) te parametri radijusa pojedinog atoma. Radijusi atoma u solvatacijskim računima empirijske su prirode te su provjereni na velikom nizu molekula i korištenjem teorijskih računa različite složenosti. Od poznatijih su UFF, UAKS, UAHF i UA0. SMD¹²³ solvatacijski model je visoko parametrizirani model pogodan za izračun termodinamičkih veličina solvatiranih sustava.

Prema radu Ho i sur. iz 2009. godine,¹²⁴ prihvatljiva pogreška računa solvatacijske energije može se postaviti na oko 1 kcal mol^{-1} , što je blisko točnosti eksperimentalnih metoda. Eksplicitnim dodavanjem molekula otapala oko promatranog sustava, simuliraju se solvatacijske ljuske (obično samo prva solvatacijska ljuska) koje se nalaze u bliskom kontaktu sa sustavom i time se razlikuju od molekula otapala koje nisu u „dodiru“ s otopljenom tvari. Vrlo je zahtjevno opisati prvu solvatacijsku ljusku ovakvim pristupom. Molekule otapala, intermolekulskim silama vezane na solut, mijenjaju slobode kretanja, moguće vibracije te reaktivnost otopljene tvari, a ponekad sudjeluju i u samoj kemijskoj reakciji. Poseban problem predstavlja voda kao otapalo, čije molekule u velikom broju mogu zauzeti prostor prve solvatacijske ljuske. Osim toga, razmještaj i međusobna interakcija molekula voda predstavljaju dodatni problem. Molekule vode međusobno su povezane brojnim vodikovim vezama i često se u računima, tijekom geometrijske optimizacije, udaljuju od otopljene tvari te međusobno formiraju grozdove. Za svaku kemijsku strukturu potrebno je odrediti „optimalni broj molekula otapala“ u solvatacijskoj ljusci, pri čemu struktura sa solvatacijskom ljuskom tvori zasebnu kemijsku speciju.

Kombinacija implicitnog i eksplicitnog opisa otapala računalno je najzahtjevnija, ali daje najtočnije podatke.¹²⁵ U literaturi se takav pristup opisuje kao supramolekulski solvatacijski model.

3.6. Osnove kvantno-kemijskih izračuna

Osnovne vrste izračuna koji se koriste u računalnoj kvantnoj kemiji su:

- Izračun ukupne energije određenog molekulskog sustava.

Također se mogu izračunati svojstva povezana s energijom i/ili rasporedom elektrona (raspodjelu naboja u sustavu, EPR, NMR, IR spektri). O izračunu energije molekulskog sustava bilo je riječi u prethodnim poglavljima.

- Optimizacija geometrija

Procedura kojom je moguće locirati stacionarnu točku, najčešće minimum, koja se nalazi u blizini početne, odnosno zadane geometrije. Optimizacija geometrija temelji se na postepenoj promjeni geometrije molekule u smjeru gradijenta potencijalne energije sustava.

- Izračun vibracijskih frekvencija molekula

Poznavanje frekvencija vibracija molekule (kao i vibracijskih valnih funkcija) omogućuje izračun termodinamičkih potencijala molekule. Uz to se može predvidjeti IR spektar molekule te okarakterizirati priroda stacionarne točke na plohi potencijalne energije (minimum kao

stacionarna točka nultog reda, prijelazno stanje kao stacionarna točka prvog reda, itd.) pri određivanju mehanizama kemijskih reakcija

- Rješavanje elektronske strukture u vremenski promjenjivom potencijalu

Vremenski promjenjivim električnim i magnetskim potencijalima prikazuje se interakcija elektromagnetskog zračenja s elektronskom strukturom molekule, a kao rezultat izračuna dobivaju se podaci o eksitacijskim energijama i drugim spektroskopskim svojstvima.

3.6.1. Optimizacija geometrija

Strukturne promjene unutar molekule (duljine veza, vrijednosti veznih i diedarskih kuteva) uzrokuju promjene energije te ostalih svojstava molekulskog sustava. Iteracijski postupak određivanja molekulске strukture u energijskom minimumu uz pomoć optimizacijskih algoritama unutar određenog koordinatnog sustava, koji opisuje položaj svih jezgara (npr. korištenjem Cartezijevih ili internih koordinata), naziva se optimizacija geometrija.

Optimizacija geometrija je metoda energijske minimizacije. Ploha potencijalne energije (engl. *potential energy surface*, PES) matematička je funkcija koja svakoj molekulskoj strukturi (geometriji) pridružuje odgovarajuću energiju. Za dvoatomske molekule to je jednodimenzijski prikaz udaljenosti dviju jezgara na osi x i energije na osi y . Za veće molekulске sustave, ploha potencijalne energije ima toliko dimenzija koliko je potrebno parametara da se jednoznačno definira geometrija molekule ($3N-6$ dimenzija za nelinearne molekule, pri čemu je N broj atoma u molekuli). Svaka točka na plohi potencijalne energije predstavlja posebnu molekulsku geometriju.

Minimum je točka na dnu PES-a (u potencijalnoj jami) iz koje pomak u bilo kojem smjeru vodi u stanje više energije. Sve komponente gradijenta energije u toj točki iznose 0, dok su sve svojstvene vrijednosti matrice drugih derivacija pozitivne. Razlikujemo lokalni i globalni minimum, pri čemu lokalni predstavlja točku najniže energije na ograničenom dijelu PES-a, dok je globalni najniža energetska točka na cijeloj plohi potencijalne energije. Različiti minimumi mogu odgovarati reaktantima i (među)produktima u slučaju razmatranja određenih reakcijskih koordinata, odnosno konformerima u slučaju promatranja nekog fleksibilnog molekulskog sustava.

Stacionarna točka u kojoj je jedna svojstvena vrijednost matrice drugih derivacija negativna, a sve ostale pozitivne, naziva se sedlasta točka prvog reda. Ona označava prijelazno stanje koje povezuje dvije lokalne strukture, tj. dva minimuma.

Geometrijskom optimizacijom lociraju se stacionarne točke na PES-u, no tom se procedurom ne može odrediti njihova priroda, tj. radi li se o minimumu ili prijelaznom stanju. Za karakterizaciju stacionarne točke potreban je frekvencijski račun na teorijskoj razini na kojoj je provedena i optimizacija geometrija. U minimumu, kao i točki prijelaznog stanja, sve prve derivacije energije po koordinatama svih atomskih jezgara iznose nula. Svaka uspješna optimizacija završava lociranjem stacionarne točke.

Za geometrijsku optimizaciju nužni su ulazni podaci, odnosno „input“ koji sadrži približnu ili traženu molekulsku geometriju prikazanu internim ili Kartezijevim koordinatama. Odabrani algoritam računa gradijent i energiju u toj točki. Zatim se određuje koliko daleko i u kojem će smjeru biti provedena sljedeća iteracija. Gradijent ukazuje na smjer u kojem energija najbrže raste, kao i na stupanj tog nagiba. Najpoznatiji algoritmi za optimizaciju koji koriste podatke o energijama i gradijentu) su metoda najstrmijeg spusta (engl. *steepest descent*)¹²⁶ i metoda konjugiranog gradijenta (engl. *conjugate gradients*),¹²⁷ koji se odlikuju slabom konvergencijom. Većina drugih algoritama izračunava matricu hesijana tj. vrijednost drugih parcijalnih derivacija energije s obzirom na molekulske koordinate. One opisuju zakrivljenost površine u toj točki, što pridonosi točnijem predviđanju sljedeće iteracije. Najpoznatiji od njih su: Newton-Raphsonov algoritam,¹²⁸ Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shannov (BFGS) algoritam,¹²⁹ optimizacija racionalne funkcije (engl. *Rational Function Optimization*) za prijelazna stanja, itd. Kada optimizacijski postupak iskonvergira, tj. ispuni pod određene uvjete, locirana struktura je stacionarna točka.

3.6.2. Frekvencijski račun

Osnovne namjene frekvencijskog računa su:

- karakterizacija prirode (stacionarnih) točaka (minimum ili prijelazno stanje),
- izračun frekvencija gibanja (vibriranja) atoma unutar molekula,
- izračun termokemijskih parametara.

Kako bismo potpuno i točno okarakterizirali stacionarne točke na PES-u, potrebno je izračunati vibracije atoma unutar molekule izračunom drugih derivacija energije po atomskim koordinatama te rješavajući vibracijsku Schrödingerovu jednadžbu (svaki vibracijski mod opisan je različitim potencijalom).

Dobivamo skup molekulskih vibracija, te informaciju odgovara li optimizirana struktura minimumu na PES-u (reaktanti, intermedijeri i produkti) ili prijelaznom stanju. Ako postoji samo jedna imaginarna vibracijska frekvencija, dobiven je minimum u svim smjerovima, osim

u smjeru vibracije s imaginarnom frekvencijom, što znači da izračunata geometrija predstavlja prijelazno stanje (engl. *transition state*, TS) na toj plohi potencijalne energije. Ako je locirana stacionarna točka s dvije i više imaginarnih frekvencija, potrebno je dodatno optimizirati strukturu dok se ne locira stacionarna točka s jednom (TS) ili bez (minimum) imaginarnih frekvencija. Postojanje jedne imaginarne frekvencije karakterizira točku kao prijelazno stanje, no potrebno je primijeniti dodatne procedure kako bi se došlo do zaključka koje minimume ispitivano prijelazno stanje povezuje. Za potvrdu reakcijskog puta, koji je definiran TS-om, potrebno je pratiti oba reakcijska smjera duž gradijenta intrinzičke reakcijske koordinate (engl. *Intrinsic Reaction Coordinate*, IRC).

IRC^{130,131} predstavlja parcijalno optimiziranje geometrija duž reakcijske koordinate. Početna točka u IRC računu odgovara strukturi prijelaznog stanja, a njezina se geometrija postupno optimizira (po reakcijskoj koordinati) do (među)produkata (napredni smjer) i reaktanata (povratni smjer). Dobivene strukture, nakon dodatne geometrijske optimizacije, daju (lokalne) minimume koji odgovaraju reaktantima i (među)produktima povezanim tim prijelaznim stanjem.

Ukupna elektronska energija izračunata geometrijskom optimizacijom odgovara minimumu na PES-u. U stvarnosti molekula nema tu energiju, jer sama molekula nikada nije u stanju potpunog mirovanja, već će imati određeno vibracijsko, rotacijsko i translacijsko gibanje. Energija nulte točke (engl. *zero-point energy*) računa se kao zbroj elektronske energije i tzv. „korekcije nulte točke”, energije koja odgovara najnižem vibracijskom stanju molekule pri 0 K. U entalpiju i entropiju molekule uračunavaju se različiti doprinosi translacijskog, vibracijskog i rotacijskog gibanja molekule (izvode se iz frekvencijskog računa) pribrojenu energiji nulte točke. Tu su uključene aproksimacija idealnog plina za translacijsko gibanje, kao i aproksimacija rigidnog rotora za rotacijsko gibanje. U izračunima se mogu namjestiti parametri za temperaturu (unaprijed zadana temperatura iznosi 298 K) i tlak (unaprijed zadani tlak iznosi 1 atm), te masa izotopa pojedinih elemenata. Gibbsova slobodna energija jednaka je razlici entalpije i entropije pomnožene s temperaturom ($G = H - TS$).

3.7. Molekulska dinamika

Kada se proučavaju biološki sustavi poput enzima, geometrija s najnižom energijom nije od presudne važnosti. Naime, realni biološki sustavi egzistiraju u ravnotežnoj smjesi različitih konformera,^{132,133} čija zastupljenost ovisi o njihovim relativnim energetske stabilnostima, a izmjerene veličine odgovaraju statističkom prosjeku pri određenoj temperaturi.

Kako bi se računalnim metodama istraživani sustav vjerodostojno opisao, potrebno je dobiti reprezentativni uzorak (ansambl) struktura pri danoj temperaturi, T . Nakon toga, makroskopske veličine koje odgovaraju eksperimenim podacima irračunavaju se kao statistički prosjeci reprezentativnog ansambla. Za dobivanje reprezentativnih ravnotežnih ansambala najčešće se primjenjuju Monte Carlo¹³⁴ simulacije ili klasične molekulske-dinamičke (MD) simulacije.

Monte Carlo metode temelje se na (slučajnim) perturbacijama molekule, ali ne daju uvid u dinamičke procese u promatranom sustavu, poput konformacijskih promjena. Kako se tema disertacije odnosi na smještanje i ponašanje inhibitora u aktivnom mjestu MAO B enzima, izabrana je metoda molekulske dinamike.

Ukupna potencijalna energija sustava definira se kao suma veznih (energija istezanja veze, promjena valentnog i diedarskog kuta) i neveznih (elektrostatske i van der Waalsove interakcije) doprinosa:

$$U_{total} = U_{vezna} + U_{nevezna} \quad (75)$$

odnosno:

$$U_{total} = U_{veza} + U_{kut} + U_{torzija} + U_{el} + U_{vdW} \quad (76)$$

ili složenijim pristupom (npr. kada se u nevezne interakcije uključuje i potencijal vodikovih veza, a u vezne potencijal koji vodi računa o izvan-ravninskim deformacijama ili pak sadrži mješovite članove).

MD simulacije uključuju rješavanje jednadžbi gibanja (za međudjelovanje atoma u klasičnom molekulske-mehaničkom polju sila), od kojih je najjednostavnija Newtonova jednadžba:

$$m_i \frac{\partial^2 q_i}{\partial t^2} = m_i a_i = F_i \quad (77)$$

gdje $q_i \equiv (x_i, y_i, z_i)$ predstavljaju vektor položaja odnosno m_i masu i -tog atoma, pri čemu je i broj od 1 do N . Sila je negativna derivacija potencijalne energije definirane poljem sila:

$$F_i = -\frac{\partial U(q_1, q_2, \dots, q_N)}{\partial q_i} \quad (78)$$

Kombiniranjem prethodnih dviju jednadžbi, dobije se diferencijalna jednadžba:

$$m_i \frac{\partial^2 q_i}{\partial t^2} = m_i \frac{\partial v_i}{\partial t} = -\frac{\partial U(q_1, q_2, \dots, q_N)}{\partial q_i} \quad (79)$$

čije rješenje predstavlja vremensku evoluciju koordinata (i pripadajućih brzina) čestica u $3N-6$ dimenzionalnom faznom prostoru ($3N-5$ za linearne molekule) definiranom položajima N čestica. Rješenje jednadžbe (79) nazivamo trajektorija. Ona se dobiva integriranjem jednadžbe (79) za niz vremenskih koraka. Za kompleksnije sustave to se ne može se postići analitički, pa se Newtonove jednadžbe gibanja rješavaju numeričkim integriranjem (npr. korištenjem Verletovog,¹³⁵ Verletovog algoritma za brzine ili leap-frog¹³⁶ algoritma).

Većina numeričkih metoda zasniva se na razvoju funkcija q i p u Taylorov red. Verletovim algoritmom za brzine (engl. *velocity-Verlet*) računaju se vektori položaja i brzine za niz jednako razmaknutih vremenskih koraka ($t + \Delta t$). Položaji čestica računaju se iz jednadžbe dobivene razvojem funkcije položaja u Taylorov red zaustavljen na drugoj derivaciji:

$$q(t + \Delta t) = q(t) + v(t)\Delta t + \frac{1}{2}a(t)\Delta t^2 \quad (80)$$

gdje Δt predstavlja integracijski korak, $q(t)$ vektor položaja čestica, a brzina ($v(t)$) i akceleracija ($a(t)$) su prva, odnosno druga derivacija položaja $q(t)$ po vremenu u trenutku t . Prema tome, u trenutku t , dovoljno je znati trenutačni položaj čestica te vektore brzine i akceleracije kako bi se odredio novi položaj čestica u trenutku $t + \Delta t$. Vektor brzina i akceleracije određuje se iz:

$$v(t + \Delta t) = v(t) + \frac{1}{2}[a(t) + a(t + \Delta t)]\Delta t \quad (81)$$

gdje je:

$$a(t + \Delta t) = -\left(\frac{1}{m}\right) \nabla U[q(t + \Delta t)] \quad (82)$$

Novo brzine (u $t + \Delta t$) mogu se izračunati tek nakon izračuna sila u novom položaju, jer su za izračun novih brzina potrebne i stare i nove vrijednosti sila. Ovaj algoritam sinkronizirano izračunava brzine i položaj, što je njegova prednost.

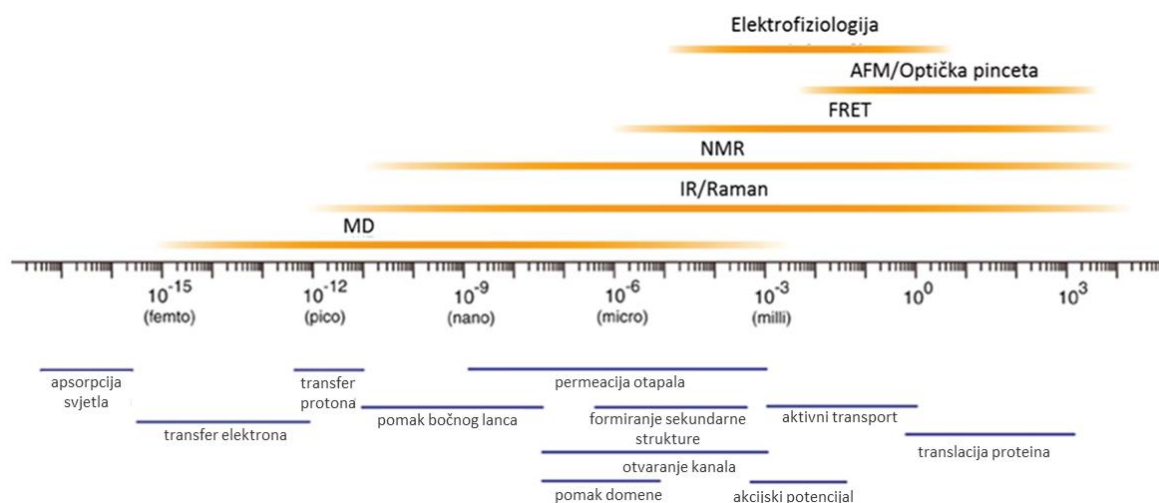
Leap-frog algoritam računa vektor brzina u točki koja odgovara polovici vremenskog koraka ($t + \frac{1}{2}\Delta t$), zatim se te brzine koriste za izračun novog vektora položaja

$$q(t + \Delta t) = q(t) + v\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) \Delta t \quad (83)$$

$$v\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) = v\left(t - \frac{1}{2}\Delta t\right) + a(t)\Delta t \quad (84)$$

Algoritam funkcionira tako da se položaji i akceleracije određuju za vremena $t, t + \Delta t, t + 2\Delta t, \dots$, dok se brzine računaju za poluvremena ($t - \frac{1}{2}\Delta t, t + \frac{1}{2}\Delta t, t + \frac{3}{2}\Delta t, \dots$), od čega i potiče ime metode (*leap* engl. skok, *frog* engl. žaba). Leap-frog i velocity-Verlet algoritam proizvest će iste trajektorije ako se uzmu identični polazni uvjeti.

Najbrže gibanje u tipičnom (klasično opisanom) molekulskom sustavu je vibracijsko gibanje. Za tipičnu C–H vezu, koja u infracrvenom spektru apsorbira na $2850\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$, period je otprilike 10^{-14} s. Iz tog razloga, za sustave koji imaju vezan vodik na teški atom (a takvi su svi biološki sustavi), integracijski korak (Δt) ne bi trebao biti veći od 1 fs, što u praksi znači da je za MD simulaciju koja je duga 10 ns potrebno napraviti 10^7 koraka, odnosno toliko puta izračunati energiju, silu, brzine atoma, itd. MD simulacije mogu se koristiti za promatranje fenomena koji se događaju na vremenskoj skali od 1 ps do 1 ms (Slika 14.), poput gibanja pojedinačnih bočnih lanaca aminokiselina i pojedinih domena proteina, no kompleksnija gibanja koja se događaju izvan navedene vremenske skale još su uvijek nedohvatljiva ovom metodom.



Slika 14. Vremenska rezolucija različitih biofizičkih metoda (Slika je prerađena slika iz reference 137).¹³⁷

Kako bi se smanjio broj izračuna potreban za simulaciju određenog vremenskog perioda, razvijeni su algoritmi kojima se fiksira udaljenost C–H vezâ, što omogućuje korištenje vremenskog koraka 2–5 fs. Najčešće se koriste algoritmi SHAKE¹³⁸ (i njegove modifikacije) te LINCS.¹³⁹

Početna struktura, odnosno položaji atoma, najčešće se preuzmu iz poznate strukture (npr. dobivena rentgenskom ili neutronsom difrakcijom). Početne brzine dodijele se nasumično svakoj pojedinoj čestici tako da slijede Maxwell-Boltzmannovu raspodjelu na danoj temperaturi:

$$P(v_i) = \sqrt{\frac{m_i}{2\pi k_B T}} \exp\left(-\frac{m_i v_i^2}{2k_B T}\right) \quad (85)$$

gdje k_B označava Boltzmannovu konstantu. Trenutačna temperatura se računa prema ekviparticijskom teoremu:

$$T(f) = \frac{1}{(3N - n)k_B} \sum_{i=1}^N \frac{|p_i(t)|^2}{m_i} \quad (86)$$

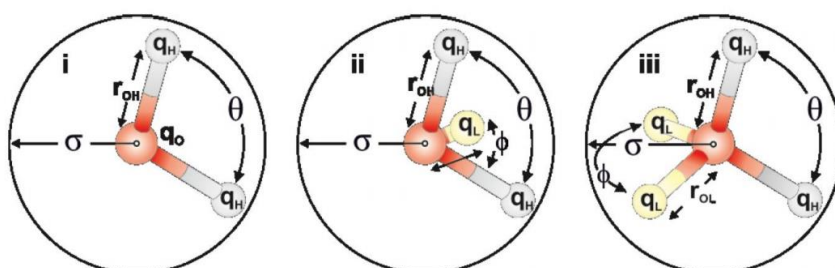
gdje je N ukupan broj atoma, a n je broj ograničenih stupnjeva slobode.

Molekulska dinamika zasniva se na ergotskoj hipotezi, koja pretpostavlja da će gotovo sva (najvjerojatnija) mikrostanja sustava biti zastupljena ukoliko se ispitivani sustav promatra kroz dovoljno dug vremenski period, pa prema tome možemo adekvatno izračunati makroskopske veličine koje odgovaraju eksperimentalnim vrijednostima.

Većina bioloških sustava nalazi se u vodenom mediju koji uvelike utječe na dinamiku i svojstva sustava. Kako bi MD simulacije što bolje odražavale stvarne uvjete, u obzir se uzimaju i molekule otapala, na implicitan ili eksplicitan način. Zbog snažnog međudjelovanja molekula polarnog otapala (vode) s nabijenim aminokiselinskim ostacima, mogućnosti postojanja premošćujućih molekula vode među njima, entropijskog doprinosa uslijed translokacije molekula vode prilikom konformacijskih promjena i smještanja liganda u aktivno mjesto, nužno je otapalo uključiti na eksplicitan način kako bi se što preciznije opisale navedene promjene.

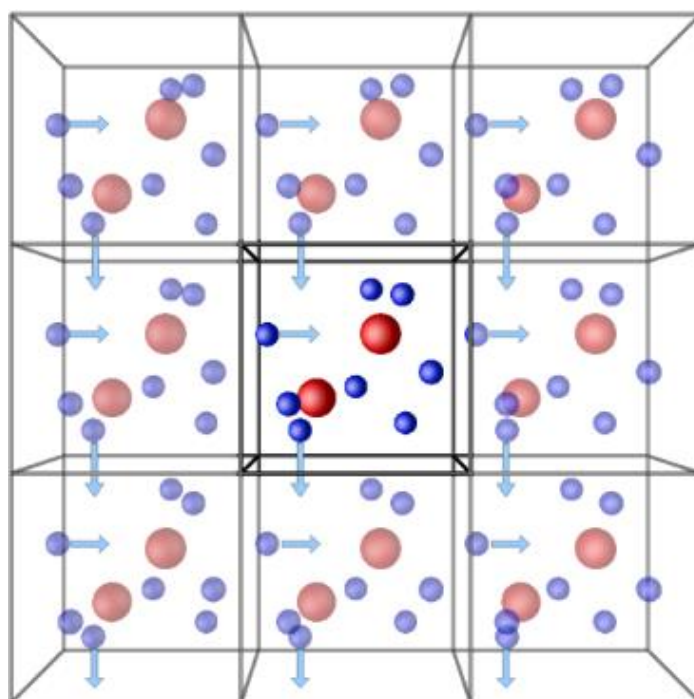
Proučavani sustav smješta se u tzv. kutiju (engl. *box*) molekula otapala (najčešće vode), koja obično ima oblik kocke ili krnjeg oktaedra. Korištenjem krnjeg oktaedra postiže se očuvanje sferne simetrije uz korištenje manjeg broja molekula otapala. Broj molekula za solvatanje makromolekule, npr. srednje velikog proteina, mjeri se u desecima tisuća, pa je iz tog razloga bilo potrebno razviti različite modele molekula vode. Jedan od najkorištenijih modela je tzv. SPC (engl. *simple point charge*) model, u kojemu su duljine veza i kutovi između atoma fiksni, dok se elektrostatske interakcije definiraju pomoću tri točkasta naboja, a interakcije između atoma kisika aproksimiraju se Lennard-Jonesovim potencijalom.

Također, često se koriste modeli vode TIP n P, gdje n označava broj točkastih naboja koji su pridruženi molekuli vode. TIP3P model vode (korišten u izradi ove disertacije) konceptualno je isti kao SPC¹³⁸, no parametri su poboljšani. TIP4P i TIP5P¹⁴⁰ modeli definiraju vodu sa četiri odnosno pet točkastih naboja, što rezultira potpunijim opisom molekula vode te točnijim predviđanjem njihova ponašanja. TIP n P modeli razlikuju se po parametrima (iznosima naboja, duljinama veza te kutovima) (Slika 15.).



Slika 15. Shematski prikaz TIP3P, odnosno SPC (lijevo), TIP4P (sredina) te TIP5P (desno) modela vode. Slika je preuzeta iz reference 141.¹⁴¹

Kako bi se izbjegli rubni efekti nastali korištenjem kutije otapala, koriste se periodični rubni uvjeti (engl. *periodic boundary conditions*, PBC). U PBC metodi promatrani sustav okruži se njegovim kopijama (Slika 16.), a čestice u promatranoj kutiji imaju interakciju s tzv. virtualnim česticama u kopijama osnovne kutije (sustav nije okružen vakuumom). Ako se dogodi da neka čestica izađe iz simulirane kutije, identična čestica će ući u promatranu kutiju sa suprotne strane. Na taj način osigurava se očuvanje broja čestica, mase, energije i linearnog momenta u promatranoj kutiji.



Slika 16. Primjena periodičnih rubnih uvjeta. Sustav je u svakom smjeru okružen svojim slikama, te prilikom izlaska čestice iz promatranog sustava nova (virtualna) čestica u njega ulazi. Slika je preuzeta iz reference 142.¹⁴²

Jedna od najbitnijih značajki PBC metode je da nijedna molekula unutar simulacijske kutije „ne osjeća“ vakuum unutar tzv. granične (engl. *cut-off*) udaljenosti, tj. udaljenosti do koje se računaju nevezne interakcije, te su na taj način izbjegnuti efekti površine koji inače mogu bitno utjecati na sustav i na dobivene rezultate.

Kada se promatra sustav odvojen od okoline, broj čestica (N) i volumen (V) su konstantni. Simulacijom takvog sustava MD metodama uz korištenje Newtonovih jednadžbi gibanja, generiraju se mikrostanja iste energije, tzv. mikrokanonski (NVE) ansambl. Prosjek neke fizikalne veličine mora tada biti jednak prosjeku ansambla prema ergotskoj hipotezi. No kako eksperimentalni uvjeti obično podrazumijevaju konstantan tlak i temperaturu, MD simulacijama želi se generirati ili kanonski (NVT) ili izobarno-izotermni (NpT) ansambl. Budući da je temperatura funkcija raspodjele energije po česticama u sustavu, najjednostavniji način za regulaciju temperature je modifikacija kinetičke energije čestica. Razlikujemo termostate s jakim i slabim sprežanjem, te stohastičke termostate. Kod termostata s jakim sprežanjem temperatura se mijenja vrlo naglo:

$$v = v_0 \sqrt{\frac{T_0}{T}} \quad (87)$$

gdje su v_0 početna brzina, T_0 početna temperatura, a T . Zato oni nisu odgovarajući za generiranje kanonskog ansambla. Korištenjem metoda slabog sprežanja neizravno se skaliraju brzine čestica. Primjer često korištenog termostata sa slabim sprežanjem je Berendsenov termostat, kojim se simulira uranjanje sustava u kupelj konstantne temperature:

$$\frac{dT(t)}{dt} = \frac{1}{\tau_T} (T_0 - T(t)) \quad (88)$$

dok se intenzitet interakcije sustava i kupelji regulira tzv. konstantom sprežanja (τ_T). Faktor skaliranja kod Berendsenovog termostata¹⁴³ definiran je izrazom:

$$\lambda^2 = 1 + \frac{\Delta t}{\tau_T} \left(\frac{T_0}{T(t)} - 1 \right) \quad (89)$$

Važno je naglasiti da se upotrebom Berendsenovog termostata ne postiže pravi kanonski ansambl.

Langevinov termostat najpoznatiji je od stohastičkih termostata. Zasniva se na interakciji fiktivnih čestica s promatranim sustavom, odnosno izmjeni kinetičke energije putem sudara. Fiktivne čestice opisane su Langevinovom dinamikom:¹⁴⁴

$$m \frac{d^2 q_i}{dt^2} = -\nabla U - \gamma m \frac{dq}{dt} + R(t) \sqrt{2\gamma k_B T} \quad (90)$$

gdje $R(t)$ predstavlja stohastički član, a γ koeficijent trenja. Na sve čestice djeluje nasumična sila W_i , kao posljedica sudara:

$$m \frac{d^2 q_i}{dt^2} = -\nabla U - \gamma p_i + W_i(t) \quad (91)$$

gdje je γ koeficijent trenja. Korištenjem Langevinovog termostata dobiva se „pravi“ kanonski ansambl, no moment čestica nije očuvan te se zbog toga ne preporuča njegovo korištenje prilikom računa dinamičkih veličina.

Održavanje konstantnog tlaka, što je nužno za NpT ansambl, postiže se skaliranjem udaljenosti među česticama (koje može biti izotropno i anizotropno) te njihovih brzina. Jedan od najjednostavnijih barostata je Berendsenov barostat.¹⁴³ Ovaj barostat funkcionira po principu analognom istoimenom termostatu. Sustav je spregnut s vanjskim tlakom (p_0) prema izrazu:

$$\frac{dp}{dt} = \frac{p_0 - p}{\tau_p} \quad (92)$$

gdje je τ_p konstanta sprezanja. Promjena volumena opisana je izrazima:

$$\frac{dq}{dt} = v + \alpha q \quad (93)$$

$$\frac{dV}{dt} = 3\alpha V \quad (94)$$

Promjena volumena sustava uslijed promjene tlaka ovisi o kompresibilnosti sustava β :

$$\frac{dp}{dt} = -\frac{1}{\beta V} \frac{dV}{dt} = -\frac{3\alpha}{\beta} \quad (95)$$

te je moguće parametar α izraziti uz pomoć kompresibilnosti i konstante sprezanja:

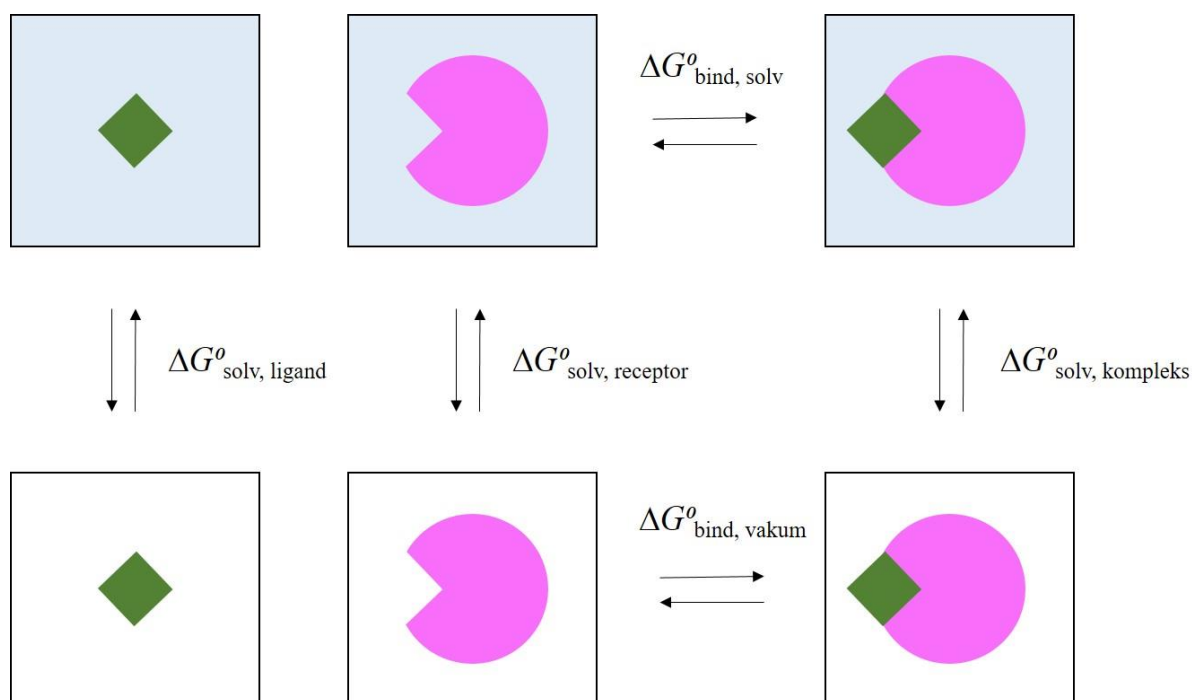
$$\alpha = -\frac{\beta(p_0 - p)}{3\tau_p} \quad (96)$$

Najzahtjevniji doprinos energiji sustava su nevezne interakcije, čiji se broj skalira brojem atoma u sustavu. Kod računanja van der Waalsovih sila, iznos privlačnih interakcija opada s r^{-6} , a odbojnih s r^{-12} , dok broj interakcija raste proporcionalno s r^2 (volumenom sfere oko promatranog atoma). Van der Waalsove interakcije brzo konvergiraju, a uvođenje granične vrijednosti (engl. *cut-off distance*), čini njihovo izračunavanje manje računalno zahtjevnim. Energijski doprinos elektrostatskih interakcija energijski doprinos opada s r^{-1} , što konvergenciju čini praktički nemogućom, budući da broj interakcija raste s kubom udaljenosti. Zato doseg računanja interakcija definiramo graničnom udaljenošću. Kako zanemarivanje elektrostatskih interakcija nakon izvan tog dosega često rezultira poteškoćama u optimizaciji ili strukturnim artefaktima, koriste se metode tzv. mekog gašenja ili funkcija sklopke.

Kada se koriste periodični rubni uvjeti, elektrostatski doprinos može se izračunati primjenom Ewaldove sumacije.¹⁴⁵ Ona se zasniva na razdvajanju energijskog doprinosa na dva člana koji opisuju kratki, odnosno dugi doseg, od kojih jedan brzo trne u realnom, a drugi u recipročnom (Fourierovom) prostoru. Ewaldova metoda modificirana je kasnije uvođenjem brze Fourierove transformacije (engl. *particle mesh Ewald*, PME^{146,147}) kako bi se ubrzao izračun za sustave s velikim brojem atoma.

3.7.1. Izračun Gibbsovih energija

Najraširenije metode za izračun energije solvatacije enzima¹⁴⁸ te energijâ vezanja liganada su MM-PBSA¹⁴⁹ (engl. *Molecular mechanics–Poisson-Boltzmann surface area*) te MM-GBSA (engl. *Molecular mechanic Generalised Born surface area*) pristupi. Korištenjem navedenih metoda, energija vezanja određuje se u vakuumu te se korigira za energijski doprinos solvatacije (Slika 17.).



Slika 17. Termodinamički ciklus kod određivanja energije vezanja MM-PBSA metodom.

Plava pozadina predstavlja specije u vodenom mediju, a bijela u vakuumu.

Prema termodinamičkom ciklusu prikazanom na Slici 17. energija vezanja računa se prema izrazima:

$$\Delta_r G_{bind,solv}^{\ominus} = G_{kompleks}^{\ominus} - G_{receptor}^{\ominus} - G_{ligand}^{\ominus} \quad (97)$$

$$\Delta_r G_{bind,solv}^{\ominus} = \Delta_r G_{bind,vakum}^{\ominus} + (\Delta_{sol} G_{solv,kompleks}^{\ominus} - \Delta G_{solv,receptor}^{\ominus} - \Delta G_{solv,ligand}^{\ominus}) \quad (98)$$

Reprezentativne strukture liganda, kompleksa i receptora mogu se generirati na dva načina; podjelom cjelokupne trajektorije kompleksa, gdje govorimo o MM-PBSA/MM-GBSA računu jedne trajektorije (engl. *single-trajectory* MM-PBSA/MM-GBSA) ili odvojenim simulacijama receptora, liganda i kompleksa, što se naziva MM-PBSA/MM-GBSA računom triju trajektorija (engl. *triple-trajectory* MM-PBSA/MM-GBSA).^{148,150} Račun triju trajektorija preporučuje se najčešće u situacijama kada prisustvo liganda znatno utječe na strukturalna i dinamička svojstva enzima.

Entalpijski doprinos Gibbsovoj energiji vezanja u uvjetima konstantnog tlaka i volumena jednak je potencijalnoj energiji sustava, a računa se pomoću polja sila, tj. molekulske

mehanike (MM). Entropijski doprinos aproksimira se vibracijskim i rotacijskim particijskim funkcijama određenima pomoću analize normalnih modova, no prilikom usporedbe sličnih sustava često se zanemaruje uz pretpostavku da su entropijski doprinosi približno isti. Polarni doprinos se računa pomoću linearne Poisson-Boltzmannove jednačbe (PB) u slučaju MM-PBSA, odnosno generalizirane Bornove jednačbe u MM-GBSA pristupu. Metode se također razlikuju u empirijskom članu hidrofobnih doprinosa. Napolarni doprinos određuje se iz površine dostupne otapalu (engl. *solvent-accessible surface area*, SASA) prema izrazu:

$$\Delta_{sol}H_{np}^{\ominus} = \gamma SASA + \beta \quad (99)$$

Mnoge studije bavile su se usporedbom MM-PBSA i MM-GBSA metodologije, a pokazano je da izbor metode, obzirom na točnost, ponajprije ovisi o istraživanom sustavu.^{148,151}

3.8. Izučavanje enzimskih reakcija računalnim metodama

Enzimski sustavi sastoje se od više tisuća teških atoma. Uz eksplicitni vodeni okoliš dolazimo do broja atoma kojeg je, zbog računalne zahtjevnosti, nemoguće tretirati QM pristupom. Postoji nekoliko pristupa ovom problemu. Najčešće korišteni su tzv. klaster model,¹⁵² QM/MM pristup,¹⁵³ te EVB¹⁵⁴ metodologija.

3.8.1. Klasterni model i QM/MM pristup

Klasterni model (engl. *Cluster model*) obuhvaća nekoliko aminokiselina u aktivnom mjestu, uključujući reaktivne aminokiselinske ostatke, kofaktor ili prostetičku skupinu (ako postoje), supstrat, relevantne molekule vode, itd.^{155–158} Pažljivo odabran sustav smješten je u implicitno opisano otapalo koje po svim parametrima odgovara vodi osim po dielektričnoj konstanti ($\epsilon = 4,0$),¹⁵⁹ što se smatra odgovarajućim okolišem za opis aktivnog mjesta enzima. Ovakav pristup prihvatljive je računalne zahtjevnosti, a dobiveni mehanizam te energetske profili reakcija u većini slučajeva u slaganju su s eksperimentalnim podacima. Vianello i sur., ovaj pristup koristili su za opis katalitičkog mehanizma MAO B,⁹ kao i za opis preferencije enzima prema pojedinim supstratima.¹⁶⁰ Ova metoda često se koristi za ispitivanje mogućih mehanizama kao i za provjeru vjerodostojnosti mehanizama prikazanih u literaturi. U izradi ove disertacije klaster metodologija korištena je za ispitivanje mehanizma inhibicije MAO B enzima.

Za razliku od klaster metodologije, QM/MM i EVB pristupi uzimaju u obzir kompletnu strukturu enzima, no aktivno mjesto i okolinu tretiraju na različit način. Kod QM/MM metoda,

za opis aktivnog mjesta koriste se metode kvantne-mehanike, dok se ostatak enzima tretira metodama molekulske mehanike. Rezultati ovog pristupa su usporedivi s pažljivo odabranom klasternom metodom, koja, ovisno o veličini odabranog sustava, često bude i manje računalno zahtjevna.^{157,161}

3.8.2. Empirijska valentna veza (EVB)

EVB pristup^{154,162} koristi reaktivno polje sila kako bi opisao aktivno mjesto u kojem dolazi do reakcije te klasično polje sila kako bi se opisao ostatak makromolekularnog sustava. Duž reakcijske koordinate koristi se potpuno klasičan opis pojedinačnih stanja, koja predstavljaju različite geometrije koje se pojavljuju tijekom kemijske reakcije. Pristup se temelji na teoriji valentne veze (engl. *valence bond theory*¹⁶³), koja se bazira na ideji da se atomske orbitale disociranih atoma kombiniraju dajući kemijsku vezu kada se molekula formira. Prednost ovog pristupa je relativna brzina u odnosu na druge metode. Zbog toga je omogućeno ekstenzivno konformacijsko uzorkovanje i proučavanje efekta različitih okolina na istu reakciju, odnosno njenu aktivacijsku i reakcijsku Gibbsovu energiju. Uspoređuje se ista reakcija u plinskoj fazi s onom provedenom u nekom kondenziranom sustavu, odnosno otopini (najčešće voda), ili reakcija u otopini s reakcijom u enzimu (divljev tipa ili mutiranom enzimu) kako bi se pokazao katalitički efekt enzima, odnosno utjecaj otapala. Referentnom nazivamo reakciju koju koristimo za kalibraciju EVB potencijala kako bi se reproducirale vrijednosti energijske barijere i Gibbsove reakcijske energije dobivene eksperimentom ili QM izračunima. Metoda je deterministička, moraju se točno znati reaktanti i produkti promatrane reakcije (predstavljaju dva VB stanja koja se miješaju).

Kako bi se sustav mogao prenositi između različitih bioloških okolina ili kondenziranih sustava, dijelimo ga u dva dijela: reaktivni (Q ili EVB) koji sadrži atome uključene u reakciju te okolnu regiju, koja sadrži sve ostalo. Reaktivna regija tretirana je isto u svim medijima. Ukupni Hamiltonijan^{164,165} tada može biti zapisan kao suma Hamiltonijana reaktivne regije (H_r), Hamiltonijana okolne regije (H_s) te Hamiltonijana intereagiranja između dviju regija (H_{rs}):

$$H_{tot} = H_r + H_{rs} + H_s \quad (100)$$

Kod EVB opisa jednostavne reakcije s dva stanja, sustav je opisan korištenjem dva VB stanja najniže energije. Ova dva stanja imaju fizikalno značenje, odnosno oni opisuju dijabatska stanja reaktanata i produkata. Izraz za valnu funkciju tada glasi:

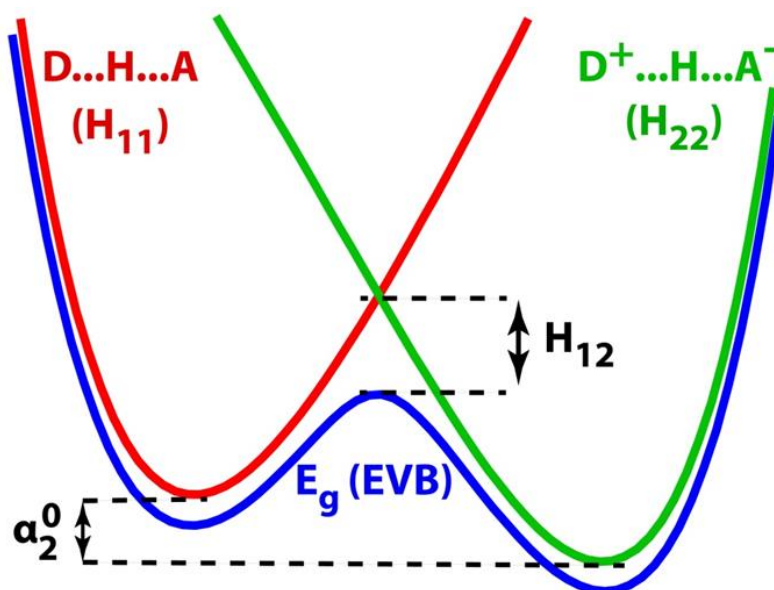
$$\psi = c_1\phi_1 + c_2\phi_2 \quad (101)$$

gdje indeksi 1 i 2 predstavljaju dva VB stanja (reaktante i produkte). Rješavanjem sekularne jednadžbe dobivamo najnižu vlastitu vrijednost, odnosno analitički EVB potencijal¹⁶⁶ u osnovnome stanju (Slika 18.):

$$E_g = \frac{1}{2} \left(H_{11} + H_{22} - \sqrt{(H_{11} - H_{22})^2 + 4H_{12}^2} \right) \quad (102)$$

gdje su matrični elementi H_{11} , H_{22} , H_{12} kompleksni integrali oblika:

$$H_{ij} = \int \phi_i H \phi_j^* d\tau \quad (103)$$



Slika 18. Odnos između dijabatskih stanja reaktanata (crvena parabola) i produkata (zeleni parabola) i rezultatni adijabatski profil (plava krivulja) osnovnog stanja E_g za hipotetsku reakciju prijenosa hidrida između dva centra D i A. Slika je preuzeta iz reference 162.¹⁶²

Nakon što smo dobili E_g , uvodi se empirijski dio EVB-a (podaci iz eksperimenta ili QM izračuna) aproksimacijom H_{11} i H_{22} analitičkim MM funkcijama, uzimajući u obzir da H_{11} i H_{22} imaju jasno fizikalno značenje, tj. predstavljaju energije dva stanja. U polju sila, reaktivne veze modelirane su Morseovim potencijalom, kako bi se moglo adekvatno opisati nastajanje, odnosno kidanje veza. Ostale komponente opisane su funkcijama tipičnim za polje sila (harmonijski potencijal, Coulomb, Lenard-Jones, itd.)

Izvandijagonalni element H_{12} predstavlja kvantno sprezanje sustava i za razliku od odgovarajućih dijagonalnih članova, nema klasičnu analogiju, već je najčešće aproksimiran eksponencijalnom ili Gaussovom funkcijom, ili u slučaju EVB pristupa, konstantnom vrijednošću, za koju je pokazano da je neovisna o kemijskom ili biološkom okruženju.¹⁶⁶ Pomoću referentne reakcije, na podatke dobivene eksperimentom ili točnim QM izračunima, kalibriraju se parametri EVB modela, H_{12} i energijska razlika između dva dijabatska stanja u plinskoj fazi ili otopini (α_2^0). Najčešće se za kalibraciju biraju Gibbsova reakcijska ($\Delta_r G$) i Gibbsova aktivacijska energija (ΔG^\ddagger). Kalibracijom dobiveni parametri zatim se mogu koristiti u različitim kemijskim ili biološkim okruženjima.

Dobiveni potencijali odgovaraju sustavu na 0 K. Da bismo što točnije opisali sustav, potrebno je uključiti i entropijski utjecaj, a isto tako napraviti adekvatno uzorkovanje konformacija (npr. koristeći simulacije molekulske dinamike), kako bismo mogli izračunati točne profile Gibbsove slobodne energije te eliminirati pogrešku izračuna uslijed pogrešno odabrane inicijalne strukture uključenih kemijskih vrsta. Aktivacijska energija može se direktno povezati s eksperimentalno određenom konstantom brzine reakcije preko teorije prijelaznog stanja korištenjem Eyringove jednadžbe:

$$k = \kappa \frac{k_B T}{h} e^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{k_B T}} \quad (104)$$

Uobičajen pristup za određivanje profila reakcijske slobodne energije u EVB metodologiji je mapiranje, odnosno „*free energy perturbation/umbrella sampling*“ (FEP/US) pristup. Konformacijsko uzorkovanje vrši se pomoću MD simulacija na mapiranom potencijalu E_m , koji je definiran kao linearna kombinacija dva Hamiltonijana:

$$E_m = \lambda H_{11} + (1 - \lambda) H_{22} \quad (105)$$

gdje λ predstavlja sprežujući parametar koji diskretno transformira sustav iz stanja reaktanata u stanje produkata, obično kroz 51 korak.¹⁶² U svakom koraku uzorkuje se konformacijski prostor definiran pomoću E_m korištenjem klasičnog MD-a. Profil slobodne energije zatim se dobiva korištenjem FEP/US^{164,167} izraza:

$$\Delta G(\xi, \lambda) = \Delta G_m(\lambda) - RT \ln \left\langle \delta(\xi(v) - \xi) e^{-\frac{(E_{g,4}) - E_m(\xi, \lambda)}{RT}} \right\rangle_m \quad (106)$$

Reakcijska koordinata definirana je energijskom razlikom između dva stanja, poznatijom kao energijski raskorak (engl. *energy gap*):

$$\xi \equiv H_{11} - H_{22} \quad (107)$$

Postupak određivanja profila slobodne energije ponavlja se onoliko puta koliko je potrebno da bi vrijednost dobivenih Gibbsovih slobodnih energija konvergirala uz prihvatljivu standardnu devijaciju.

3.9. Priprema računalnih simulacija

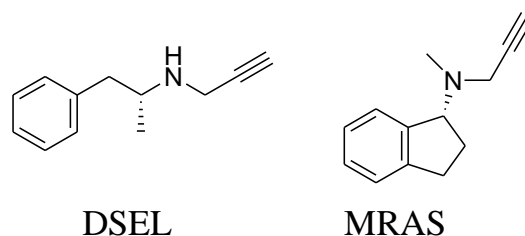
3.9.1. Parametri MD simulacija

Početna točka MD simulacija u izradi ove disertacije bila je kristalna struktura visoke rezolucije (1,7 Å) MAO B enzima u kompleksu s *N*-metil-1-aminoindanom,¹⁶⁸ preuzeto iz baze kristalnih struktura proteina (engl. *Protein Data Bank*, PDB), struktura pod kodom 2C67.¹⁶⁸ Molekule vode izbrisane su iz dobivene kristalne strukture kako bi molekule vode iz dodane kutije otapala mogle slobodno difundirati u aktivno mjesto tijekom ekvilibracijskog i produkcijskog dijela MD simulacija, bez smanjenja stupnjeva slobode kretanja molekula otapala.

Proteinska komponenta MAO B je homodimer koji sadrži FAD kofaktor (kovalentno vezan za konzervirani Cys397 aminokiselinski ostatak) u svakoj podjedinici. Protonacijska stanja pojedinih aminokiselinskih ostataka određene su korištenjem predikcijskog poslužitelja PROPKA3.1^{169,170} te procjenom mreže vodikovih veza u bliskom okruženju aminokiselinskih ostataka. Vodikovi atomi koji nedostaju dodani su korištenjem modula *tleap* unutar AmberTools16.¹⁷¹

Osim komercijalnih inhibitora RAS i SEL, izračuni su provedeni i za njihove derivate, desmetilselegilin (DSEL) i *N*-metilrazagilin (MRAS) (Slika 19.), budući da je u simulacijama zamijećeno da prisutnost metilne skupine na aminskom dušikovom atomu inhibitora pozitivno utječe na vezanje inhibitora u aktivno mjesto. Slično ponašanje ranije je viđeno kod drugih supstrata, primjerice kod histamina i metil-histamina.¹⁶⁰

Geometrije FAD kofaktora, komercijalnih inhibitora RAS i SEL, kao i njihovih derivata DSEL i MRAS, su optimizirane te su im izračunati RESP (engl. *restrained electrostatic potential*) naboji na HF/6–31G(d) teorijskoj razini kako bi bili usklađeni s primijenjenim GAFF (engl. *general AMBER force field*) poljem sila, dok je ostatak enzima modeliran upotrebom AMBER ff14SB polja sila.



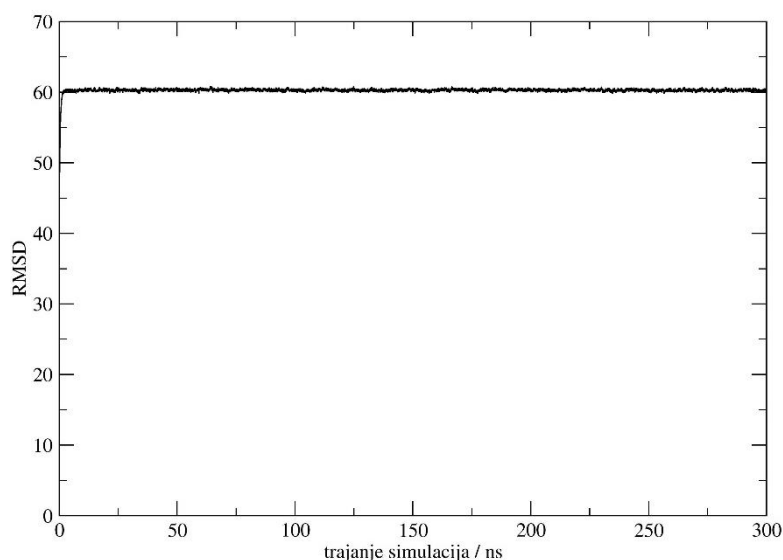
Slika 19. Strukture derivata ireverzibilnih inhibitora MAO B desmetilselegilina (DSEL) i *N*-metilrazagilina (MRAS).

Pripremljena su četiri kompleksa s inhibitorским molekulama RAS, SEL, MRAS, odnosno DSEL, ručno smještenim u obje podjedinice MAO B enzima umjesto aminoindanskog predloška u kristalnoj strukturi. Formirani proteinski kompleksi solvatirani su korištenjem kutije u obliku krnjeg oktaedra popunjenog TIP3P molekulama vode, dodatkom sloja širine 10 Å sa svake strane proteina. Ukupni naboj sustava neutraliziran je sa 10 Na⁺ iona, kako bi se simulacije mogle provoditi uz periodične rubne uvjete u svim smjerovima. Nakon toga, provedena je optimizacija geometrija unutar pomoću programa AMBER16.¹⁷¹ Optimirani sustavi postupno su zagrijavani od 0 do 300 K u trajanju od 30 ps korištenjem NVT uvjeta, a zatim su provedene produkcijske MD simulacije korištenjem vremenskog koraka od 2 fs pri konstantnom tlaku (1 atm) i temperaturi (300 K) koja je održavana korištenjem Langevinovog termostata¹⁴⁴ s frekvencijom kolizija 1 ps⁻¹. Na kraju, prema literaturinim podacima, tako mala promjena u simuliranoj temperaturi, s 300 K na 310 K (temperatura tijela), ima izuzetno mali utjecaj na dobivene trajektorije ovakvih i sličnih sustava. Veze koje uključuju vodikove atome

ograničene su korištenjem algoritma SHAKE,¹³⁸ dok su dalekosežne elektrostatske interakcije računane korištenjem PME metode.¹⁷² Nevezne interakcije ograničene su na 10 Å.

Nakon provedbe MD simulacija u trajanju od 300 ns, uzorkovana je svaka deseta struktura iz zadnjih 100 ns, te je dobiveni skup klasteriran s obzirom na udaljenost između C(α)-atoma inhibitora i atoma N5 FAD-a u A podjedinici dimera MAO B. Analogno tome, strukture iz A podjedinice korištene su u daljnjim analizama.

Procjena kvalitete MD simulacija provedena je analizom RMSD (engl. *Root Mean Square Deviation*) grafova provedenih simulacija (RMSD je računat s obzirom na početnu strukturu) (Slika 20.). RMSD grafovi ukazuju na to da je 300 ns dovoljno trajanje simulacije kako bi se adekvatno uzorkovalo ponašanje inhibitora u aktivnom mjestu MAO B.



Slika 20. Primjer: RMSD graf za MRAS, stabilni dijelovi uzeti su za daljnje analize.

Analogna analiza napravljena je za ostale inhibitore.

Proračun slobodne energije vezanja, ΔG_{BIND} za vezanje liganada u aktivno mjesto MAO B enzima napravljen je korištenjem ustaljenog protokola MM-GBSA¹⁴⁸ iz programskog paketa AmberTools16¹⁷¹ uobičajene metode za izračunavanje slobodne energije vezanja iz dijelova MD trajektorije¹⁷³ s prosječnom pogreškom od 1–3 kcal mol⁻¹.^{148,174}

3.9.2. Parametri QM klasternih simulacija

Kako bi se rasvijetlio točan molekularni mehanizam ireverzibilne inhibicije MAO B enzima, korištene su QM metode na tzv. klasternom modelu enzima,¹⁵⁷ o kojem se opširnije raspravljalo

u teoretskom dijelu disertacije. Nakon MD simulacija kreiran je klaster model MAO B koji osim odgovarajućeg inhibitora uključuje FAD kofaktor, aminokiselinske ostatke Tyr435, Tyr398, Tyr326, Tyr188, Ile199, Lys296, Cys172 i Gln206, te tri molekule vode. Optimizacijom geometrije klastera preuzetih iz MD simulacija na M06-2X/6-31+G(d,p) teorijskoj razini dobivene su stacionarne točke koje odgovaraju kompleksu enzima i inhibitora, što ujedno predstavlja i početnu točku za QM račune. Na svim dobivenim stacionarnim točkama (minimumima i prijelaznim stanjima) proveden je frekvencijski račun na navedenoj razini teorije, dok su poboljšane energije izračunate na fiksnoj geometriji korištenjem PBE0/6-311++G(2df,2pd) razine teorije (sukladno sa prijašnjim rezultatima na istom biološkom sustavu).^{9,160,175} Za provedbu svih računa korišten je implicitni model otapala (CPCM model, uz vrijednost dielektrične konstante otapala $\epsilon = 4,0$).

Budući da je ionizacijsko stanje Lys296 dvojbeno,^{175,176} u procjeni mehanizma inhibicije MAO B propargilaminskim inhibitorima razmatrana su oba slučaja, protonirani i neutralni Lys296.

3.9.3. Priprema EVB simulacija

EVB simulacije uključuju klasične simulacije temeljene na konceptima molekulske mehanike, odnosno polja sila. Za razliku od klasičnih MD simulacija, u EVB-u postoje dva stanja, stanje reaktanata i stanje produkata. Sukladno tome, polje sila je parametrizirano za oba stanja. U slučaju propargilaminskih inhibitora, reaktanti RAS i SEL uključeni su kao neutralne molekule, dok je reaktivni dio MAO enzima predstavljen lumiflavinskim kosturom FAD kofaktora. Budući da u reakciji dolazi do prijenosa hidrida (H^-) s C(α)- atoma na N5-atom flavinskog kofaktora (FAD), produkte predstavljaju pozitivno nabijeni imin te anion kofaktora $FADH^-$.

Početna točka za EVB simulacije predstavlja kristalna struktura MAO B enzima u kompleksu s NYP inhibitorom (PDB ID: 1GOS¹⁷⁷). NYP inhibitor ručno je zamijenjen odgovarajućim inhibitorom korištenjem VMD¹⁷⁸ i UCSF Chimera programa¹⁷⁹. Proteinski model uključuje jednu podjedinicu MAO B enzima unutar simulacijske sfere radijusa 30 Å s centrom na reaktivnom N5-atomu, te 1662 molekule vode. Svim proteinskim atomima izvan ove sfere ograničeno je kretanje harmonijskim potencijalom od 200 kcal mol⁻¹ Å⁻².

Nakon definicije reaktanata (λ_0) i produkata (λ_1), sustav je pomoću FEP procedure prevođen iz smjera reaktanata u smjer produkata korištenjem programa qdyn6 koji je implementiran u programski paket Q v.6.¹⁸⁰ Za nereaktivni proteinski dio korišteni su parametri polja sila OPLS-AA173, dok je za molekule vode korišten TIP3P model vode. Parametri za

flavinski kofaktor i Cys397 za koji je FAD vezan, preuzeti su iz prethodnih simulacija na MAO B, dok su parametri za reaktante i produkte generirani korištenjem antechamber alata u sklopu programskog paketa AMBER 16. Naboji na atomima liganada određeni su korištenjem QM računa na HF/6-31G(d) teorijskoj razini kojima je dobiven elektrostatski potencijal, iz kojeg se potom pomoću RESP sheme, implementirane unutar AmberTools16 paketa, određuju pojedinačni naboji na atomima.

Sustav se ekvilibrirao 2,2 ns, nakon čega su uslijedile FEP simulacije u kojima se sustav postepeno prevodio iz stanja reaktanata u stanje produkta kroz 51 korak.¹⁶² Svaki FEP korak trajao je 100 ps, ukupno 5,1 ns za svaku reakciju. Kako bi uzorkovanje duž kemijske koordinate bilo što kvalitetnije, FEP simulacije provedene su 10 puta (napravljeno je 10 replika) za svaki inhibitor. Krajnji rezultat je uprosječna vrijednost za svih 10 replika. Blaga ograničavajuća sila (engl. *positional restraint*) od $0,5 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ primijenjena je na reaktivne atome, kako bi se izbjegli nekonvergirani profili slobodne energije povezani s ograničenom dužinom trajanja simulacija, što je ustaljena praksa u sličnim istraživanjima. Uz to, osigurana je dodatna ograničavajuća sila na udaljenost između reaktivnog N5 na FAD-u i C(α) na inhibitoru ($0-3 \text{ \AA}$, $5 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$).

Profili EVB simulacija dobiveni su analizom podataka dobivenih simulacijama programom qfep6 koji je dio programskog paketa Q v.6.

3.9.4. Priprema referentne reakcije za kalibraciju EVB metode

Enzimska kataliza definira se kao ubrzanje odabrane kemijske reakcije u odnosu na referentnu nekataliziranu reakciju, najčešće u vodenoj otopini ili plinskoj fazi. U provedbi EVB simulacija nužno je prvo definirati referentnu reakciju, a glavna pretpostavka je da se ta reakcija odvija istim mehanizmom kao i ona u enzimu. U slučaju reakcije inhibicije MAO B enzima nema dostupnih referentnih eksperimentalnih podataka za nekataliziranu reakciju, pa je zbog toga reakciju između flavina i komercijalnih propargilaminskih inhibitora bilo potrebno modelirati QM pristupom. Referentnu reakciju u slučaju propargilaminskih inhibitora predstavlja prijenos hidrida između modela kofaktora FAD (lumiflavina) i odabranog inhibitora u vodi, primjenom razine teorije M06-2X/6-31+G(d,p) uz SMD implicitnu solvataciju na istoj razini. Odabir referentne reakcije u plinskoj fazi standardni je protokol, no referentna reakcija može se odvijati i u vodenom mediju. Tijekom izrade ove disertacije ispitana su oba pristupa, no referentna reakcija u implicitnom mediju pokazala se boljim izborom radi polarnosti samog procesa. EVB Hamiltonijan parametriziran je tako da reproducira izračunate ΔG^\ddagger i ΔG_r te je ista reakcija

simulirana u enzimu MAO B korištenjem tih parametara. Ova aproksimacija je prihvatljivija jer je dokazano kako su EVB parametri neovisni o fazi (okolini) u kojoj se provodi reakcija, ako se reakcija odvija istim mehanizmom.¹⁶⁴ Navedeni pristup omogućava istraživanje utjecaja okoline na ispitivanu reakciju, a ako je okolina enzim, omogućuje procjenu ubrzanja u odnosu na referentnu reakciju u vodenoj otopini, odnosno procjenu utjecaja samog enzima na promatranu katalitičku reakciju.

Početne konformacije oba sustava preuzete su iz provedenih MD simulacija, uz redukciju strukture enzima i ostatka flavinskog kofaktora. Strukture prijelaznih stanja za danu reakciju u QM modelu potvrđene su frekvencijskom analizom te su nakon toga IRC izračunom dobiveni odgovarajući reaktanti i produkti koji to prijelazno stanje povezuju. Izračunate vrijednosti prikazane su u Tablici 8. Reakcijska slobodna energija izračunata je kao razlika između kompleksa reaktanata i intermedijarne točke u IRC izračunu, u kojoj je lumiflavinska skupina hidrirana, što je u skladu s prijašnjim radovima.^{55,175,181} Računi su provedeni korištenjem programskog paketa Gaussian 09.¹⁸²

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Molekulsko-dinamičke simulacije enzima MAO B u kompleksu s propargilaminskim inhibitorima

4.1.1. Rezultati MD simulacija komercijalnih inhibitora

Izračunata Gibbsova energija vezanja (ΔG_{BIND}) za komercijalne inhibitore, RAS i SEL, je izrazito negativna, što pokazuje na to da se vrlo povoljno vežu u aktivno mjesto enzima MAO B. Gibbsove energije vezanja, kao i dekompozicija energije vezanja po aminokiselinskim ostacima značajnima za vezanje prikazana je u Tablici 1.

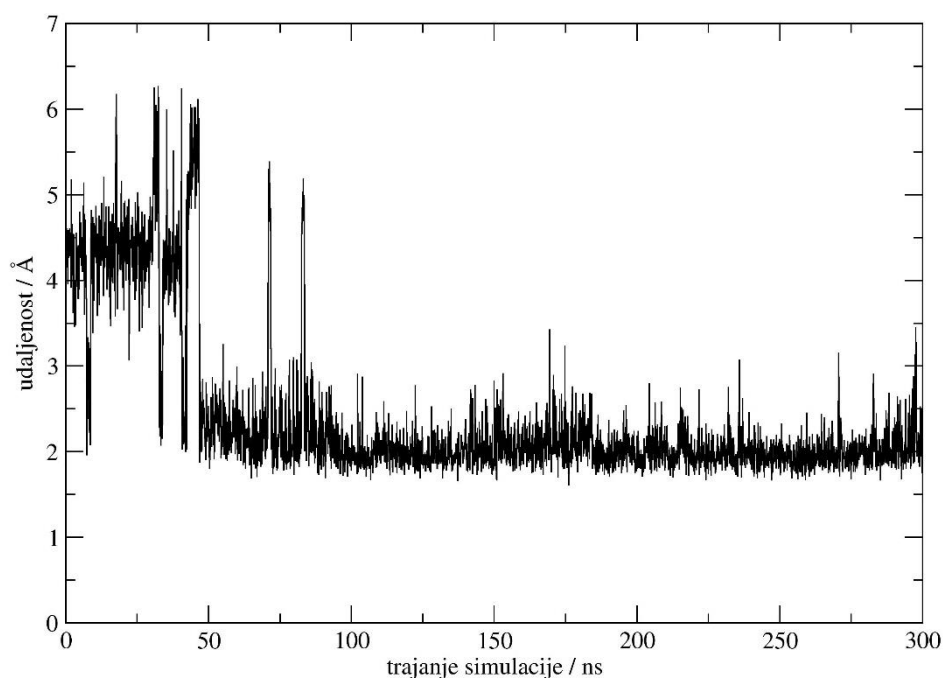
Tablica 1. Izračunata slobodna Gibbsova energija vezanja (ΔG_{BIND}) iz MD simulacija korištenjem MM-GBSA pristupa i dekompozicija slobodne energije po pojedinom aminokiselinskim ostacima (u kcal mol⁻¹). Za usporedbu su prikazane eksperimentalne vrijednosti relevantnih veličina.

INHIBITOR	RAS	SEL
ΔG_{BIND}	-28,36	-31,83
FAD	-2,94	-3,26
Gln206	-2,53	-2,59
Tyr435	-0,87	-1,39
Tyr398	-1,73	-1,25
Leu171	-0,56	-0,91
Tyr60	-0,71	-0,60
Cys172	-0,18	-0,52
Phe343	-0,82	-0,51
Ile198	-0,05	-0,51
Gly434	-0,15	-0,38
Leu328	-0,41	-0,35
Tyr326	-0,55	-0,32
Thr399	-0,07	-0,21
Val173	-0,04	-0,18
Gly205	-0,09	-0,18
Met341	-0,14	-0,16
Gln191	-0,04	-0,13
Arg42	-0,01	-0,11
Tyr188	-0,03	-0,11
Ile199	-0,94	-0,10
Ser59	-0,10	-0,10
$K_i(\text{MAO B})^*$	700 nM ^{183,184}	9 nM ¹⁸⁵
$\text{IC}_{50}(\text{MAO B})$	82,5 nM ^{186,187}	1,3 nM ^{188,189}

* K_i (konstanta inhibicije) predstavlja omjer konstanta brzine vezanja i otpuštanja inhibitora u aktivno mjesto enzima. IC_{50} predstavlja količinu inhibitora potrebnu da se inhibira 50 % enzima

U slučaju komercijalnih inhibitora, SEL se veže bolje od RAS. Uzrok tome povoljniji je smještaj u aktivno mjesto uslijed veće konformacijske fleksibilnosti SEL, što se slaže s eksperimentalno izmjerenim IC_{50} i K_i vrijednostima (Tablica 1.). Također, energije vezanja u dobrom su kvalitativnom slaganju s vrijednostima koje su određene za kromenske (benzopiranske) MAO inhibitore,¹⁹⁰ iako su apsolutne vrijednosti za SEL ($\Delta G_{\text{BIND}} = -31,83$ kcal mol⁻¹) i RAS ($\Delta G_{\text{BIND}} = -28,36$ kcal mol⁻¹) izgledno pretjerane. Pretjerane vrijednosti uobičajene su za MM-PBSA pristup, a sama problematika ekstenzivno je diskutirana¹⁵⁰ te autori snažno naglašavaju korisnost ovog pristupa u predviđanju relativnih odnosa u energijama vezanja za bimolekularne komplekse. Ako razmotrimo relativnu razliku između RAS i SEL, SEL se veže 3,5 kcal mol⁻¹ bolje od RAS. Ovu vrijednost možemo usporediti s relativnim odnosom eksperimentalnih vrijednosti IC_{50} i K_i (Tablica 1.). Iako navedene eksperimentalne vrijednosti ne reflektiraju samo sposobnost vezanja inhibitora, daju nam koristan uvid u trendove vezanja. Iz vrijednosti IC_{50} dobiva se relativna razlika od 2,6 kcal mol⁻¹, dok iz K_i možemo dobiti razliku od 2,5 kcal mol⁻¹. Obje vrijednosti pokazuju izvrsno slaganje dobivenih rezultata s eksperimentalnim vrijednostima, što potvrđuje kvalitetu odabranog računalnog modela.

Daljnjom analizom MD trajektorija i dekompozicijom ΔG_{BIND} vrijednosti na doprinos pojedinih aminokiselinskih ostataka, dobiven je uvid u to koji su ostaci odgovorni za vezanje inhibitora u aktivno mjesto. Tablica 1. pokazuje da su inhibitori u aktivnom mjestu primarno stabilizirani interakcijom s FAD kofaktorom. Na tu interakciju otpada oko 10 % ukupne energije vezanja, koja je ostvarena putem izrazito povoljnih $\pi \cdots \pi$ interakcija između aromatskog sustava flavinskog kofaktora i acetilenskih skupina inhibitora. Upravo ovaj tip interakcije odgovaran je za pozicioniranje inhibitora u konformaciju povoljnu za reakciju s FAD-om. Zanimljivo je da RAS sa svojom amino (-NH) skupinom tvori vodikovu vezu s karbonilnom C4=O grupom na FAD-u. Ova vodikova veza postojana je tijekom cijele MD simulacije (Slika 21.) s prosječnom vrijednosti od 3,427 Å, no ipak je ukupna interakcija RAS-a s FAD-om manja.



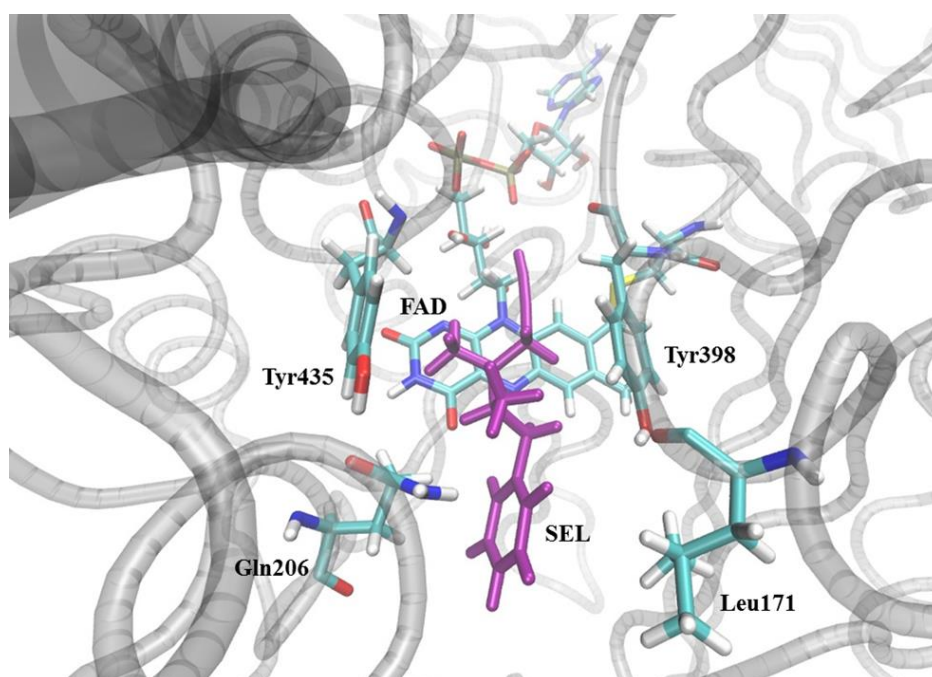
Slika 21. Evolucija udaljenosti N (amino, RAS) – O (C4,FAD) u RAS-u tijekom 300 ns MD simulacije.

Kod selegilina je amino dušik pozicija metilirana. Time je spriječeno stvaranje vodikove veze što rezultira drugačijim vezanjem u aktivno mjesto. QM metodama unutar ove disertacije pokazano je da ovaj tip vodikove veze smanjuje reaktivnost inhibitora, o čemu će biti riječi u poglavlju 4.2. Nadalje, RAS se može ponašati kao akceptor i donor vodikove veze u interakciji s aminokiselinama u aktivnom mjestu, što omogućuje, primjerice, ostvarivanje vodikove veze s –OH skupinama tirozina u aktivnom mjestu. S druge strane, SEL može biti samo akceptor vodikove veze, a ova mogućnost je dodatno sterički ograničena metilnom skupinom na dušiku. Kao rezultat toga, vodikove veze SEL-a u aktivnom mjestu ostvaruju se četiri puta rjeđe od RAS-a (Tablica 2.), no SEL se ipak veže jače od RAS-a. Ovi rezultati vode do zaključka da kapacitet inhibitora za stvaranje vodikovih veza nije ključan za vezanje, već su hidrofobne i elektrostatske interakcije te koje potiču vezanje inhibitora u aktivno mjesto. Taj zaključak se koristi kao vrlo važna smjernica za razvoj novih inhibitora.

Tablica 2. Učestalost ostvarivanja vodikovih veza i kontakata s Tyr u aktivnom mjestu kod komercijalnih MAO B inhibitora.

	Broj vodikovih veza / ns	Broj kontakata s Tyr / ns
RAS	0,8	0,3
SEL	0,2	0,5

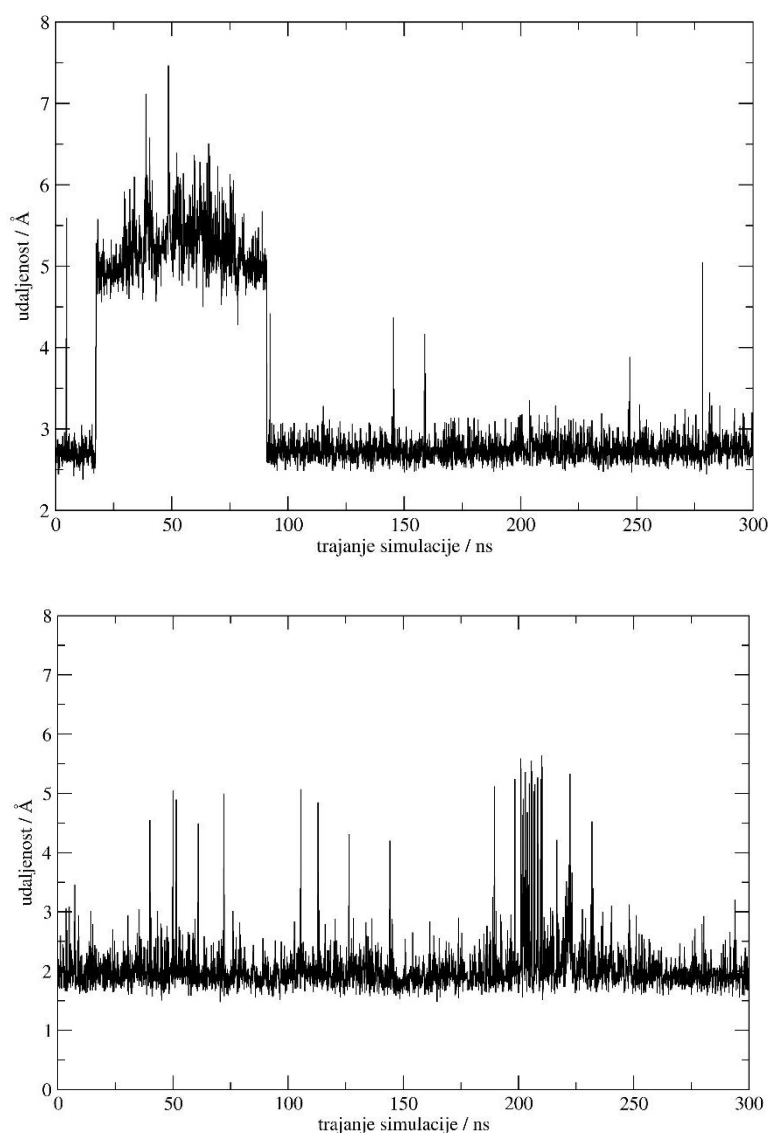
Navedeni rezultati pokazuju da metiliranje aminskog dušika ima znatan utjecaj na vezanje inhibitora u aktivno mjesto. Ako razmotrimo učestalost nastajanja vodikovih veza, vidljivo je da SEL ima oko četiri puta manji potencijal stvaranja vodikovih veza u usporedbi s RAS-om. Analizom pojedinačnih aminokiselnih ostataka, uočeno je da su oba inhibitora stabilizirana N–H··· π interakcijom vodika amidne skupine Gln206 s aromatskim sustavom inhibitora (Slika 22.).



Slika 22. Smještaj inhibitora SEL u aktivno mjesto MAO B (isječak iz MD simulacije).

Ova činjenica još potvrđuje važnost aromatskih dijelova u dizajnu potentnih inhibitora, tj. da je aromatski dio molekule inhibitora odgovoran za vezanje u hidrofobnu šupljinu MAO B enzima.¹⁹¹ Tyr435 i Tyr398 eksperimentalno³⁶ su i računalno^{160,191} okarakterizirani kao važni za pravilno orijentiranje supstrata za kemijsku reakciju, a njihove mutacije dovode do smanjenja aktivnosti enzima.³⁵ Dekompozicijom energije vezanja također je potvrđena važnost

ovih dvaju aminokiselinskih ostataka, uz tri druga aromatska aminokiselinska ostatka; Tyr60, Tyr326 i Phe343. Osim toga, napravljena je analiza učestalosti kontakta s tirozinskim ostacima u aktivnom mjestu unutar 2.25Å od molekule inhibitora (Tablica 4.). SEL gotovo dva puta češće ostvaruje interakciju s Tyr u aktivnom mjestu u usporedbi s ostala tri inhibitora. Ovaj podatak ukazuje na važnost hidrofobnih kontakata za vezanje inhibitora u aktivno mjesto, kao na i važnost konformacijske slobode molekule u aktivnom mjestu. SEL uspostavlja češće kontakte s Tyr od RAS-a, što je u skladu s eksperimentalnim podacima koji ukazuju na jače vezanje SEL-a u aktivno mjesto. Slično su u svojim istraživanjima uočili Gehe i sur.³⁵ koji su pokazali da se IC₅₀ SEL-a smanjuje 15 do 130 puta zbog mutacija Tyr398Phe te Tyr435Phe. Osim toga, pokazano je da –OH skupine Tyr398 i Tyr435 u aktivnom mjestu ne sudjeluju u vezanju supstrata, već stvaranjem vodikovih veza sa susjednim aminokiselinama (Gln206 i Leu171) fiksiraju hidrofobni kavez; upravo zato njihova mutacija u Phe smanjuje mogućnosti vezanja (Slika 23.).

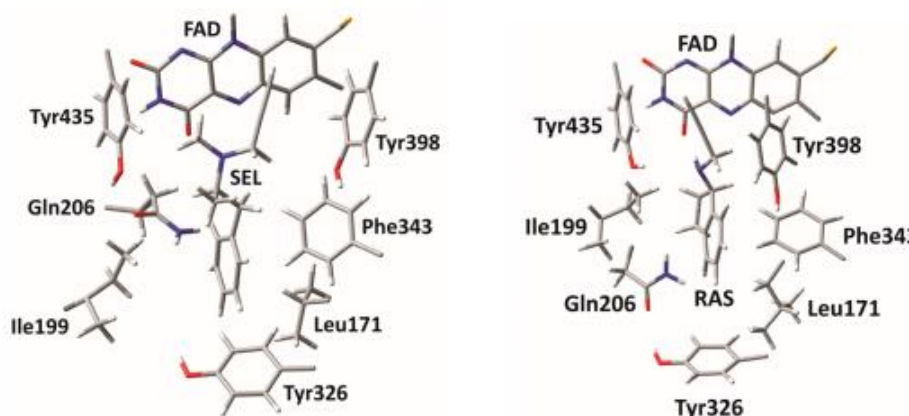


Slika 23. Evolucija udaljenosti između O (amidni, bočni lanac) Gln206 – O (hidroksilni) Tyr435 (prosječno 3.353 Å) (gore) te O (peptidni) Leu171 i –O (hidroksilni) Tyr398 (prosječno 2.024 Å) na primjeru simulacije sa SEL (dolje).

SEL je također puno fleksibilnija molekula koja sadrži više veza oko kojih je moguća rotacija, što omogućava zauzimanje konformacija u kojima su povoljniji kontakti s drugim hidrofobnim aminokiselinskim ostacima poput Leu171, Cys172 te Gly434.

Posebno su zanimljive interakcije inhibitora s Ile199, koji je eksperimentalno,^{11,192} kao i računski,¹⁶⁰ identificiran kao „*gating residue*“ (aminokiselinski ostatak koji promjenom konformacije regulira oblik i volumen aktivnog mjesta enzima, te regulira ulaz supstrata ili inhibitora) zajedno s Tyr326¹⁰ u nekim istraživanjima. Ile199 očuvan je u svim do sada

proučavanim MAO B, osim u slučaju goveđeg MAO B koji na tom mjestu ima Phe, koji je na analognom mjestu konzerviran u MAO A. Pokazano je da Ile199 u tzv. „zatvorenoj konformaciji“ dijeli šupljinu MAO B na hidrofobni ulazni dio i supstratnu šupljinu, pri čemu nastaje dvodijelna konfiguracija aktivnog mjesta, dok „otvorena konformacija“ omogućava fuziju oba dijela u jednodijelnu šupljinu ukupnog volumena $\sim 700 \text{ \AA}^3$, koja je značajno veća od supstrate tako i inhibitore.^{11,45,192} Budući da je veća i izduženija molekula od RAS-a, SEL pomiče Ile199 i Tyr326 koji zauzimaju „otvorenu“ konformaciju te na taj način stvaraju dovoljno veliku šupljinu da za smještaj SEL-a (Slika 24.). Zbog toga dolazi do smanjene interakcije s ta dva aminokiselinska ostatka. Ova promjena dovodi do ukupno jačeg vezanja SEL, zbog toga što on može reagirati s ostacima iz obiju šupljina. S druge strane, RAS je manji i kompaktniji te značajno rigidniji, što promovira vezanje u manju šupljinu, kao i interakcije s premošćujućim aminokiselinskim ostacima (Tyr326 i Ile199) između šupljina.¹⁰ Ovo je u skladu s kristalografskim podacima koji ukazuju na to da Ile199 ostvaruje kontakt s benzenskom jezgrom na RAS-u.¹⁹³ Osim toga, ovaj zaključak je snažno podržan činjenicom da se K_i vrijednosti vezanja malog inhibitora istatina povećavaju četiri puta mutacijom Ile199Tyr te čak do sto puta dvostrukom mutacijom Ile199Ala i Tyr326Ala.¹⁰



Slika 24. Reprezentativne strukture ireverzibilnih inhibitora selegilina (SEL) i rasagilina (RAS) unutar aktivnog mjesta enzima MAO B (isječci iz MD simulacija).

Ovi rezultati pokazuju važnu ulogu Ile199 i Tyr326 u selektivnosti vezanja inhibitora u aktivno mjesto MAO B, te ukazuju na važnost hidrofobnih i aromatskih kontakata za vezanje.

4.1.2. Rezultati MD simulacija derivata komercijalnih inhibitora

Po analogiji na komercijalne inhibitore RAS i SEL napravljene su simulacije za odabrane derivate komercijalnih inhibitora, DSEL i MRAS (Slika 19.), kako bi se provjerio utjecaj metilne skupine na aminskom dušiku na vezanje u aktivno mjesto MAO B.

Gibbsova energija vezanja (ΔG_{BIND}) za oba derivata očekivano je izrazito negativna, kao i za komercijalne inhibitore, što pokazuje da se vrlo povoljno vežu u aktivno mjesto MAO B enzima. Gibbsove energije vezanja, kao i dekompozicija energije vezanja po aminokiselinskim ostacima značajnima za vezanje, prikazane su u Tablici 3. Radi lakše usporedbe, uz analizirane MRAS i DSEL prikazani su ponovno rezultati i za komercijalne spojeve RAS i SEL. Rezultati u Tablici 3. pokazuju da metilna skupina povećava ΔG_{BIND} vezanja u slučaju SEL u odnosu na DSEL ($\Delta\Delta G_{\text{BIND}} = 1,01 \text{ kcal mol}^{-1}$) i u slučaju MRAS u odnosu na RAS ($\Delta\Delta G_{\text{BIND}} = 5,72 \text{ kcal mol}^{-1}$). MRAS daje i najpovoljniju energiju vezanja u odnosu na sve ispitivane spojeve. Navedeno potvrđuje važnost metilne skupine za, kao i veći afinitet tercijarnih amina u odnosu na sekundarne za vezanje u aktivno mjesto MAO B.

Tablica 3. Izračunata slobodna Gibbsova energija vezanja (ΔG_{BIND}) iz MD simulacija korištenjem MM-GBSA pristupa, i dekompozicija slobodne energije po pojedinom aminokiselinskom ostatku (u kcal mol⁻¹).

INHIBITOR	RAS	SEL	MRAS	DSEL
ΔG_{BIND}	-28,36	-31,83	-34,08	-30,83
FAD	-2,94	-3,26	-5,41	-1,26
Gln206	-2,53	-2,59	-1,05	-5,37
Tyr435	-0,87	-1,39	-2,00	-0,95
Tyr398	-1,73	-1,25	-2,03	-0,61
Leu171	-0,56	-0,91	-0,56	-1,78
Tyr60	-0,71	-0,60	-0,34	-0,29
Cys172	-0,18	-0,52	-0,67	-0,53
Phe343	-0,82	-0,51	-0,49	-0,48
Ile198	-0,05	-0,51	-0,42	-0,37
Gly434	-0,15	-0,38	-0,52	-0,08
Leu328	-0,41	-0,35	-0,17	-0,20
Tyr326	-0,55	-0,32	-0,34	-0,53
Thr399	-0,07	-0,21	-0,16	-0,01
Val173	-0,04	-0,18	-0,18	0,00
Gly205	-0,09	-0,18	-0,16	-0,54
Met341	-0,14	-0,16	0,02	0,00
Gln191	-0,04	-0,13	-0,13	-0,06
Arg42	-0,01	-0,11	-0,16	-0,01
Tyr188	-0,03	-0,11	-0,05	0,02
Ile199	-0,94	-0,10	-0,02	-0,12
Ser59	-0,10	-0,10	-0,36	-0,07
K_i(MAO B)	700 nM ^{183,184}	9 nM ¹⁸⁵		
IC₅₀(MAO B)	82,5 nM ^{186,187}	1,3 nM ^{188,189}		625 nM ¹⁹⁴

* K_i (konstanta inhibicije) predstavlja omjer konstanta brzine vezanja i otpuštanja inhibitora u aktivno mjesto enzima. IC_{50} predstavlja količinu inhibitora potrebnu da se inhibira 50 % enzima

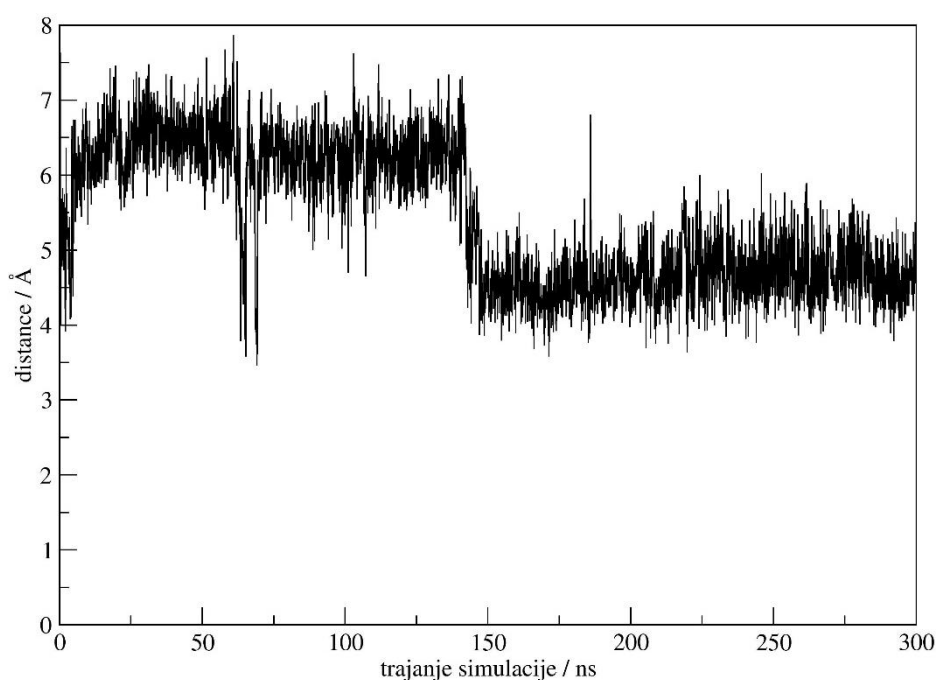
Iz Tablice 3. vidljivo je da je MRAS, poput RAS i SEL, primarno stabiliziran interakcijom s FAD kofaktorom, dok je u slučaju DSEL najznačajnija interakcija ona s Gln206. Navedeni rezultati pokazuju da metiliranje aminskog dušika ima znatan utjecaj na vezanje inhibitora u aktivno mjesto. Iz učestalosti nastajanja vodikovih veza (Tablica 4.), vidljivo je da metilirani derivati imaju manji potencijal stvaranja vodikovih veza i to dva puta manji u slučaju DSEL i SEL, odnosno čak osam puta manji u slučaju usporedbe RAS i MRAS (Tablica 4.). Ovakvi rezultati ponovno ukazuju na to da je za uspješan dizajn novih, potentnijih inhibitora, ključno koristiti tercijarne umjesto sekundarnih amina. Osim toga, takvi spojevi su lipofilniji, što im osigurava povoljniji farmakokinetički profil, budući da takvi spojevi lakše prelaze krvno-moždanu barijeru.

Tablica 4. Učestalost ostvarivanja vodikovih veza i kontakata s Tyr u aktivnom mjestu kod ispitivanih spojeva.

	Broj vodikovih veza / ns	Broj kontakata s Tyr / ns
RAS	0,8	0,3
SEL	0,2	0,5
MRAS	0,1	0,3
DSEL	0,5	0,3

Interakcije s Gln206, kao i s Tyr435 te Tyr398 u hidrofobnom kavezu ključne su interakcije kao i u slučaju komercijalnih inhibitora.

DSEL je, kao i SEL, fleksibilna molekula, što omogućava optimalne kontakte s hidrofobnim aminokiselinskim ostacima poput Leu171, Cys172 te Gly434. Na ovaj način DSEL kompenzira slabije vezanje uzrokovano gubitkom metilne skupine, no i dalje se veže značajno slabije u odnosu na SEL i MRAS. Osim toga, DSEL ostvaruje vodikovu vezu s amidnom skupinom Gln206 (Slika 25.), što značajno povećava doprinos ove aminokiseline u vezanju DSEL-a, no pozicionira DSEL u položaj nepovoljan za inhibiciju rada enzima, tj. apstrakciju hidrida.



Slika 25. Evolucija udaljenosti između N (amidni, bočni lanac) Gln206 – N DSEL (prosječno 5.408 Å).

Zbog svog hidrofobnog karaktera, MRAS ostvaruje značajne C–H \cdots π interakcije s Tyr s bočne strane FAD kofaktora, čime se pozicionira povoljno za reakciju apstrakcije hidrida koja je u poglavlju 4.2. izučavana kao mehanizam inhibicije enzima MAO B propargilaminskim inhibitorima. Za razliku od svog nemetiliranog ishodnog spoja, MRAS zbog smanjene mogućnosti stvaranja vodikovih veza zauzima puno povoljniji položaj u aktivnom mjestu, što rezultira stvaranjem povoljnih interakcija s hidrofobnim aminokiselinskim ostacima poput Gly434, Ile198, Phe 343 i posebno s Tyr398.

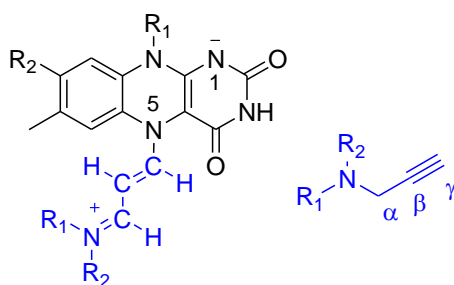
Za razliku od RAS-a, MRAS ne ostvaruje značajne interakcije s premošćujućim aminokiselinskim ostacima Tyr326 i Ile199, zahvaljujući drugačijem načinu vezanja u aktivno mjesto u odnosu na RAS, najvjerojatnije kao posljedica smanjene mogućnosti stvaranja vodikovih veza, kao i većeg volumena samog inhibitora zbog dodatka metilne skupine.

Ovi rezultati pokazuju važnu ulogu Ile199 i Tyr326 u selektivnosti vezanja inhibitora u aktivno mjesto MAO B te ukazuju na važnost hidrofobnih i aromatskih kontakata za vezanje. Na kraju, može se zaključiti da uspješno vezanje inhibitora u aktivno mjesto potiču njegova fleksibilnost te hidrofobne interakcije s aminokiselinama u objema šupljinama unutar enzima;

kombinacijom ova dva faktora postiže se potencijalno bolje vezanje inhibitora u aktivnom mjestu.

4.2. Mehanizam ireverzibilne inhibicije MAO B propargilaminskim inhibitorima

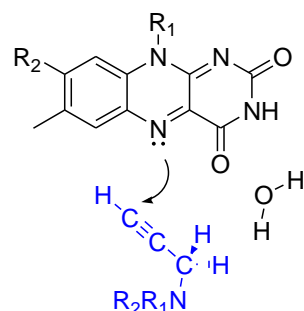
MAO enzimi sisavaca poznati su već gotovo cijelo stoljeće,^{1,195} a njihovi selektivni ireverzibilni i reverzibilni inhibitori više od 60 godina. Usprkos tome, precizni molekularni mehanizam kojim nastaje N5 adukt ireverzibilnog inhibitora s FAD-om, čime se suprimira daljnja katalitička aktivnost enzima, nije poznat.^{26,196-200} Razlog za izostanak detaljnog opisa mehanizma u literaturi postaje očit kada se promotri struktura adukta inhibitora i kofaktora (Slika 26.).



Slika 26. Lijevo: struktura adukta FAD kofaktora (crno) i propargilaminskog inhibitora (plavo). Desno: općenita struktura propargilaminskog inhibitora.

Osim što mora doći do nastajanja veze između inhibitora i N5-atoma na flavinskom kofaktoru, također je potreban pomak vodika s C(α) na C(β)-atom kako bi nastao odgovarajući produkt. Ovo jasno pokazuje da se izgledno radi o reakciji koja uključuje nekoliko koraka, čime je otežan njezin nedvojbena i potpun opis.

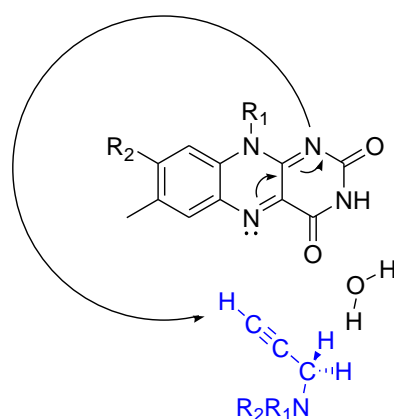
Prvi razmatrani mehanizam je direktno stvaranje veze između C(γ)-atoma inhibitora i N5-atoma flavinskog prstena (Slika 27.), što bi odgovaralo strukturi konačnog adukta. Ova reakcija uzima u obzir elektrofilni karakter N5 atoma kofaktora te mogućnost elektrofilnog napada na π -sustav inhibitora. Uzimajući SEL kao primjer, uz neionizirani Lys296, reakcija je termodinamički povoljna ($\Delta G_r = -19,8 \text{ kcal mol}^{-1}$).



Slika 27. Direktni napad C(γ)-atoma inhibitora na N5-atom flavinskog prstena.

Dobiveni adukt je stabilan te karakteriziran udaljenošću od 1,430 Å između C(γ)-atoma inhibitora i N5-atoma flavina. Međutim, kinetička barijera za ovu reakciju iznimno je visoka i iznosi 47,8 kcal mol⁻¹, što ovu reakciju čini malo vjerojatnom. Uz protonirani Lys296 ova reakcija postaje termodinamički dodatno povoljnija za 4,9 kcal mol⁻¹ te iznosi $\Delta G_r = -24,7$ kcal mol⁻¹, dok kinetička barijera ostaje ista. Slične vrijednosti dobivene su za RAS. Ovi navedeni rezultati ukazuju na to da navedeni mehanizam nije operativan.

Druga mogućnost je da se inhibitor prvo aktivira deprotoniranjem terminalnog C(γ)-atoma (Slika 28.). Budući da u aktivnom mjestu nema bazičnih aminokiselinskih ostataka koji bi preuzeli proton,⁵³ modelirali smo direktno deprotoniranje inhibitora od strane N1 iz flavinskog prstena. Deprotoniranje je potaknuto blizinom C(γ) i N5 (5,505 Å za SEL, i 3,327 Å za RAS) te činjenicom da je N1 najbazičnije mjesto flavinskog prstena.⁹ Nadalje, bazičnost ovog mjesta podržana je NBO analizom koja pokazuje da naboj na N1 atomu iznosi $-0,64$ |e|, za razliku od N5 koji ima vrijednost $-0,34$ |e|, stoga je manje vjerojatan kandidat za primanje protona.



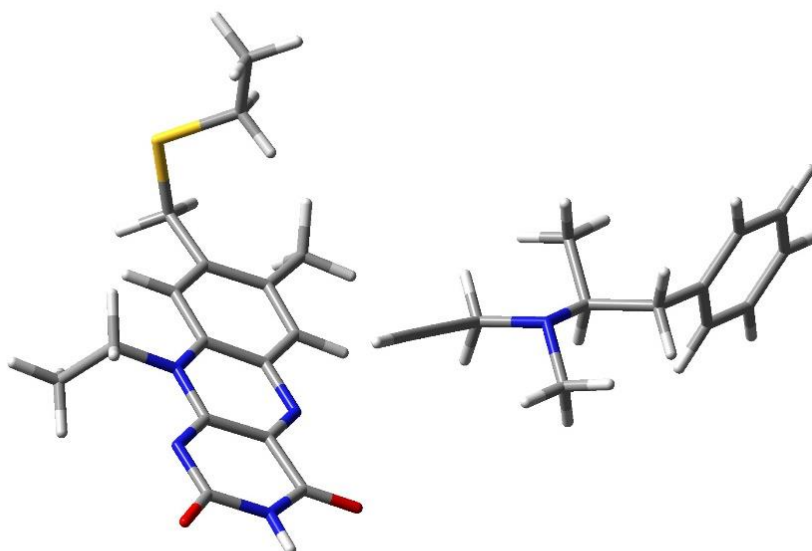
Slika 28. Deprotoniranje terminalnog C(γ)-atoma od strane N1-atoma iz flavinskog prstena.

No, dobiveni produkti su manje stabilni od početnih sustava i to 30,6 kcal mol⁻¹ za SEL u sustavu s neioniziranim Lys296 i 23,0 kcal mol⁻¹ u slučaju s ioniziranim Lys296. Takve velike razlike u energiji najbolje objašnjava razlika pK_a vrijednosti između donorskog i akceptorskog mjesta. Bazičnost flavina može se procijeniti na otprilike pK_a vrijednost 7,0 što je eksperimentalno određena vrijednost za deprotoniranje N1-H skupine u reduciranom flavinu,²⁰¹ dok je tipična vrijednost za deprotoniranje acetilena oko 25,⁵² te se prema toj vrijednosti deprotoniranje može postići samo jakim superbazom.⁵²

Dva gore navedena mehanizma odbačena su kao zbog nepovoljne kinetičke barijere (direktni napad C(γ)-atoma inhibitora na N5-atom flavinskog prstena, $\Delta G^\ddagger = 47,8$ kcal mol⁻¹), odnosno termodinamike reakcije (deprotoniranje terminalnog C(γ)-atoma od strane N1-atoma iz flavinskog prstena, $\Delta G_r = 30,6$ kcal mol⁻¹). Osim toga, reakcije prijenosa protona, u pravilu, niti nemaju kinetičku barijeru. Ispitano je i nekoliko drugih mogućih mehanizama, no oni su odbačeni zbog nemogućnosti lociranja prijelaznih stanja odnosno produkata reakcije.

QM studijom nedavno je pokazano da je mehanizam u kojemu dolazi do direktnog prijenosa hidrida povoljniji od alternativnih mehanizama u katalitičkoj razgradnji dopamina.⁹ Za modeliranje ovog procesa korišten je sličan klaster model MAO B enzima kao u ovoj disertaciji. U radu koji je uslijedio, rezultati su potvrđeni korištenjem EVB QM/MM pristupa koji je dao barijeru od 16,1 kcal mol⁻¹, što je u izvrsnom slaganju s eksperimentalno određenom vrijednosti⁴⁵ od 16,5 kcal mol⁻¹ te u potpunosti podržava predloženi mehanizam.⁵⁶ Ovaj mehanizam pokazan je kao operativan i u slučaju MAO A.^{57,160,181,202} U predloženom mehanizmu u prvom koraku dolazi do apstrakcije hidridnog aniona s C(α)-atoma supstrata na N5-atom flavinskog prstena (Slika 8.). Osim toga, pokazano je da je upravo spomenuto izdvajanje hidrida korak koji određuje brzinu reakcije. Po uzoru na katalitički mehanizam, ovaj mehanistički pristup primijenjen je i u slučaju reakcije inhibicije. Još jedan razlog koji podržava ovu tezu je činjenica da je pokazano da su i RAS i SEL tzv. „inhibitori temeljeni na mehanizmu reakcije“ (engl. *mechanism-based inhibitors*).²⁰³ Kao što je već spomenuto ranije, zbog svoje kisele –NH grupe, RAS je smješten nešto bliže FAD-u za razliku od SEL-a čija N-metilna grupa sterički ometa približavanje inhibitora FAD-u. U prvoj stacionarnoj točki SP1 (Slika 29.), udaljenost između reaktivnog N5 na FAD-u i C(α) inhibitora iznosi 3,523 Å u slučaju RAS-a te 4,386 Å za SEL, što je u skladu s prosječnim vrijednostima dobivenim iz MD simulacija koje iznose 3,669 za RAS te 4,223 Å za SEL. Ovo podržava izbor početnih geometrija za QM izračune iz MD simulacija. Direktna apstrakcija hidrida pokazana je kao povoljan mehanizam

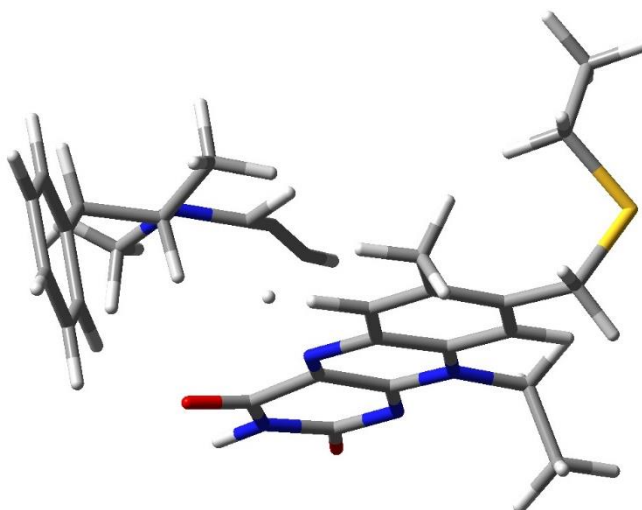
u slučaju oba inhibitora, što je u skladu s rezultatima dobivenim za MAO katalitičku reakciju.^{9,56,57,160,181,202}



Slika 29. Optimizirana geometrija reaktanata (FAD i SEL) u prvoj stacionarnoj točki (SP1).

Ostatak klastera izuzet je zbog jednostavnosti prikaza.

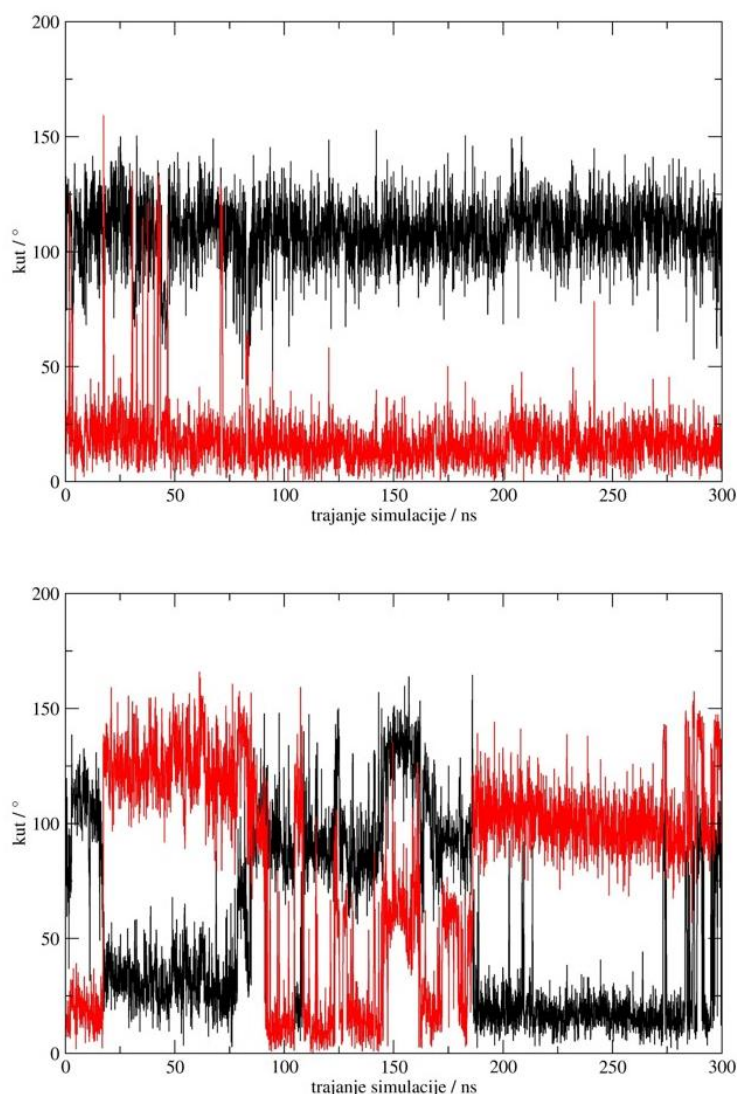
U prvom prijelaznom stanju TS1 (Slika 30.) vodik je smješten između donora, C(α)-atoma inhibitora, te akceptora, N5 atoma u flavinskom prstenu s vezama duljine 1,408 i 1,268 Å za RAS, odnosno 1,410 i 1,280 Å u slučaju SEL-a. Usprkos sličnosti geometrija prijelaznog stanja, aktivacijska slobodna energija za SEL iznosi 27,9 kcal mol⁻¹ ($\nu_{\text{imag}} = 1243i$ cm⁻¹), dok je za RAS nešto viša, 29,1 kcal mol⁻¹ ($\nu_{\text{imag}} = 1213i$ cm⁻¹). Kako se radi o koraku koji određuje brzinu reakcije, ove vrijednosti potrebno je bolje prokomentirati. Zanimljivo je da ovaj odnos aktivacijskih Gibbsovih energija predviđa da je SEL reaktivniji, što je potpuno u skladu s određenom vrijednosti k_{inact} od 0,99 min⁻¹ za SEL,⁶ odnosno 0,0533 min⁻¹ za RAS.²⁰⁴ Ako eksperimentalne parametre preračunamo u razliku u aktivacijskoj slobodnoj energiji, dobijemo 1,7 kcal mol⁻¹ u korist SEL, što se više nego izvrsno slaže s vrijednošću od 1,2 kcal mol⁻¹ koja je dobivena izračunima.



Slika 30. Optimizirana geometrija prijelaznog stanja transfera hidrida (TS1) s C(α)-atoma inhibitora SEL na N5 atom u flavinskom prstenu. Ostatak klastera izuzet je zbog jednostavnosti prikaza.

Moguće objašnjenje za slabiju reaktivnost RAS-a je nepovoljnija orijentacija u aktivnom mjestu. Naime, osim što je manje fleksibilan u odnosu na SEL, vodikova veza koju FAD ostvaruje s RAS-om, kao i interakcije s okolnim aminokiselinskim ostacima postavljaju RAS u položaj manje povoljan za apstrakciju hidrida.

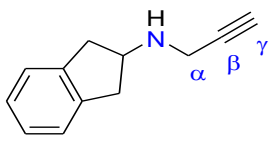
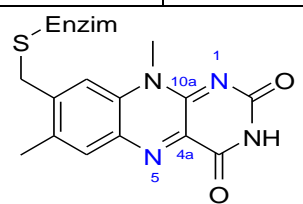
Osim toga, distribucija relevantnih kuteva $N5(FAD)\cdots H-C(\alpha)$ za oba metilenska vodika u SEL-u takva je da uvijek postoji jedan vodik koji zatvara kut od približno 0° što je najpovoljnije za transfer hidrida. Iz ovog razloga, SEL puno uspješnije zauzima optimalni položaj za reakciju s FAD-om. Nasuprot tome, kod RAS-a samo je jedan metilenski vodik u povoljnom položaju za reakciju (Slika 31.).



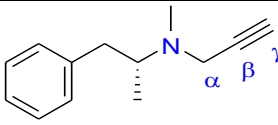
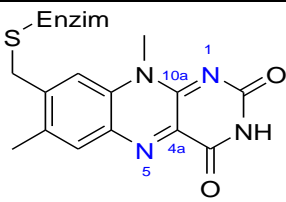
Slika 31. Evolucija kuteva između N5(FAD) - H(reaktivni, inhibitor) – C(α)(inhibitor) u slučaju RAS (gore) te SEL (dolje). Različiti vodikovi atomi su prikazani različitim bojama.

Također, zbog svojih elektron-donorajućih svojstava, metilna grupa na dušikovom atomu SEL-a stabilizira pozitivno nabijenu vrstu koja nastaje nakon apstrakcije hidrida, dok taj efekt kod RAS-a ne postoji. Navedeno najbolje ilustriraju izračuni provedeni na pojedinačnim inhibitorima koji pokazuju da je za $7,6 \text{ kcal mol}^{-1}$ energijski povoljnije maknuti hidrid s C(α)-atoma u slučaju SEL-a nego što je u slučaju RAS-a. Ove rezultate dodatno potvrđuju izračunati NBO naboji te duljine veza detaljno prikazani u tablicama 5. i 6.

Tablica 5. Distribucija naboja (NBO analiza, u $|e|$) i odabrane duljine veza (u Å) tijekom apstrakcije hidrida u reakciji ireverzibilne inhibicije s razagilinom (RAS) na (CPCM)/M06–2X/6–31+G(d,p) razini teorije.

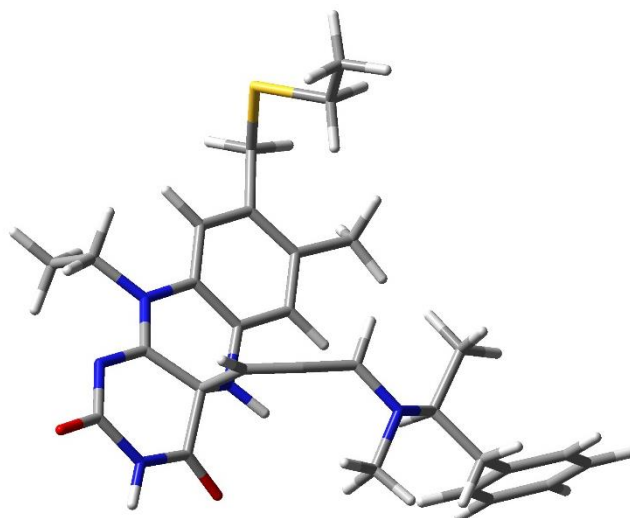
				
Atom / Veza/ Molekula	Izolirana specija	Enzim-Inhibitor Kompleks (SP1)	Prijelazno stanje (TS1)	Međuprodukt (SP2)
N _{amino}	–0,71	–0,75	–0,70	–0,72
α–H	0,24	0,24	0,37	0,46
C(α)	–0,34	–0,34	–0,23	–0,05
C(β)	–0,04	–0,03	–0,04	–0,05
C(γ)	–0,25	–0,29	–0,27	–0,30
RAS	0,00	0,01	0,37	0,53
N–C(α)	1,462	1,458	1,399	1,403
C(α)–C(β)	1,468	1,466	1,403	1,315
C(β)–C(γ)	1,205	1,210	1,236	1,306
				
Atom / Veza/ Molekula	Izolirana specija	Enzim-Inhibitor Kompleks (SP1)	Prijelazno stanje (TS1)	Međuprodukt (SP2)
N5	–0,34	–0,36	–0,54	–0,67
C4a	0,09	0,10	0,06	–0,01
C10a	0,45	0,46	0,48	0,55
N1	–0,65	–0,64	–0,65	–0,64
FAD	0,00	0,03	–0,38	–0,53
N5–C4a	1,291	1,292	1,342	1,439
C4a–C10a	1,461	1,461	1,456	1,522
C10a–N1	1,307	1,306	1,310	1,302

Tablica 6. Distribucija naboja (NBO analiza, u $|e|$) i odabrane duljine veza (u Å) tijekom apstrakcije hidrida u reakciji ireverzibilne inhibicije sa selegilinom (SEL) na (CPCM)/M06-2X/6-31+G(d,p) razini teorije.

				
Atom / Veza / Molekula	Izolirana specija	Enzim-Inhibitor Kompleks (SP1)	Prijelazno stanje (TS1)	Međuprodukt (SP2)
N _{amino}	-0,52	-0,54	-0,48	-0,50
C(N _{amino})	-0,50	-0,50	-0,50	-0,50
H(α)	0,24	0,26	0,37	0,46
C(α)	-0,34	-0,35	-0,24	-0,04
C(β)	-0,04	-0,03	-0,04	-0,06
C(γ)	-0,25	-0,27	-0,27	-0,31
SEL	0,00	0,01	0,36	0,51
N-C(metil)	1,462	1,467	1,464	1,464
N-C(α)	1,466	1,473	1,409	1,395
C(α)-C(β)	1,469	1,468	1,403	1,320
C(β)-C(γ)	1,205	1,207	1,234	1,307
				
Atom/Veza/ Molekula	Izolirana specija	Enzim-Inhibitor Kompleks (SP1)	Prijelazno stanje (TS1)	Međuprodukt (SP2)
N5	-0,34	-0,36	-0,51	-0,68
C4a	0,09	0,10	0,05	-0,01
C10a	0,45	0,45	0,48	0,54
N1	-0,65	-0,64	-0,65	-0,65
FAD	0,00	0,03	-0,36	-0,54
N5-C4a	1,291	1,290	1,336	1,434
C4a-C10a	1,461	1,458	1,455	1,515
C10a-N1	1,307	1,306	1,310	1,302

U reakcijskom kompleksu SEL-a i FAD-a (SP1) ukupni naboj specija je 0,01 odnosno 0,03 |e|, dok se u prvom prijelaznom stanju vrijednosti mijenjaju i to na 0,36 i -0,36 |e|. Ovo pokazuje da dolazi do prijenosa negativnog naboja u reakciji SEL-a i FAD-a. Tijekom reakcije SEL gubi trećinu naboja elektrona koji se smješta na FAD. Naboj na N5 koji prima hidrid mijenja se s -0,36 |e| (SP1) u -0,51 |e| (TS1). Naboj C(α)-atoma s kojeg se hidrid apstrahira mijenja se neznatno, s -0,35 |e| na -0,24 |e|, što objašnjava prisutnost susjedne amino grupe koja kompenzira gubitak elektrona. Također, ovo se očituje pozitivnijim nabojem na aminskom dušiku te smanjenjem N(amino)-C(α) udaljenosti; vrijednosti se mijenjaju s -0,54 |e| i 1,473 Å u SP1 na -0,48 |e| i 1,409 Å u TS1, što je u skladu s predloženim hidridnim mehanizmom.

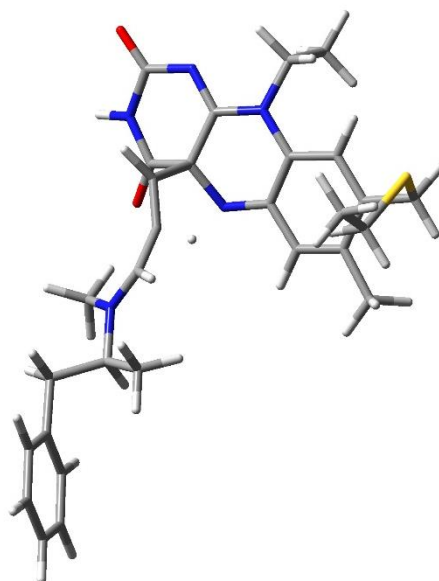
Prijelaz hidrida egzergona je reakcija, s vrijednostima $\Delta G_r = -9,8 \text{ kcal mol}^{-1}$ za SEL te $\Delta G_r = -8,5 \text{ kcal mol}^{-1}$ za RAS. Produkt ove reakcije negativno je nabijen FADH⁻ i pozitivno nabijen inhibitor. Ovo je pokazano izračunom distribucije naboja; potpuno formiranje N5-H rezultira nabojem od -0,54 |e| na FAD-u, dok naboj na SEL-u postaje 0,51 |e|. Takva elektrostatska razlika vodi do nastajanja spontanog adukta SP2 (Slika 32.), gdje se C(γ)-atom inhibitora veže za C4a-atom na FAD-u.



Slika 32. Optimizirana geometrija u drugoj stacionarnoj točki (SP2) za SEL inhibitor. Ostatak klastera izuzet je zbog jednostavnosti prikaza.

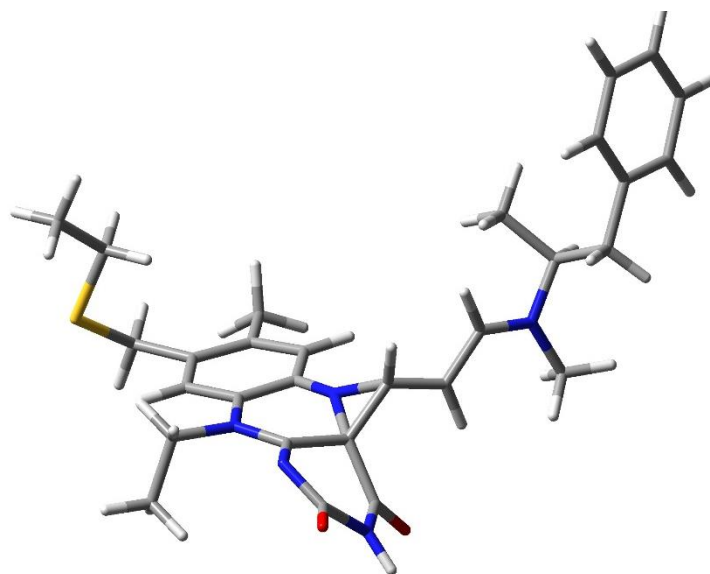
Veza između inhibitora i kofaktora u formiranom aduktu vrlo je jaka, čemu najbolje svjedoči izuzetno kratka veza između C(γ) na inhibitoru i C4a kofaktora. Ona iznosi 1,555 Å u slučaju SEL-a odnosno 1,545 Å kod RAS-a. Štoviše, izračunate vrijednosti energije disocijacije adukta su $\Delta G_{\text{diss}} = 31,1 \text{ kcal mol}^{-1}$ za SEL te $\Delta G_{\text{diss}} = 36,3 \text{ kcal mol}^{-1}$ za RAS, što dodatno potvrđuje

stabilnost veze između FAD-a i inhibitora. Ipak, unatoč stabilnom međuprojektu, reakcija ide dalje iz razloga što nadolazeće stacionarne točke imaju nižu energiju od SP2. Vezanje na FAD stvara alenski motiv unutar inhibitora, što je vidljivo iz podjednake duljine C(α)–C(β) te C(β)–C(γ) veza od 1,320 i 1,307 Å u SEL, odnosno 1,315 i 1,306 Å u RAS-u. U alenu, središnji C(β) atom je najreaktivniji odnosno najnukleofilniji, tako da sljedeći korak uključuje transfer apstrahiranog vodika s N5-atoma na C(β)-atom, no ovog puta u obliku protona (H⁺). Ovo se očituje u promjeni naboja na SEL-u s 0,51 |e| u SP2 te na 0,73 |e| u TS2 (Slika 33.).



Slika 33. Optimizirana geometrija prijelaznog stanja transfera protona (TS2) s N5 atoma C(β) atom SEL inhibitora. Ostatak klastera izuzet je zbog jednostavnosti prikaza.

Analogan transfer na C(γ) nije povoljan, dok transfer na C(α) vraća sustav natrag u SP1. Spomenuti N5–H \cdots C(β) transfer protona povezan je s barijerama od 17,6 kcal mol⁻¹ za SEL ($\nu_{\text{imag}} = 1075i$ cm⁻¹) te 18,0 kcal mol⁻¹ za RAS ($\nu_{\text{imag}} = 1283i$ cm⁻¹). U oba slučaja vrijednosti su niže od barijere za početnu apstrakciju hidrida. Nastaje SP3 međuprojekt (Slika 34.) koji sadrži napeti tročlani prsten između C4a i N5 na FAD-u i C(γ) na inhibitoru, no ipak je energijski niži u odnosu na SP2, vjerojatno zbog nestabilnosti alenske strukture u danom okruženju.



Slika 34. Optimizirana geometrija u trećoj stacionarnoj točki (SP3) za SEL inhibitor. Ostatak klastera izuzet je zbog jednostavnosti prikaza.

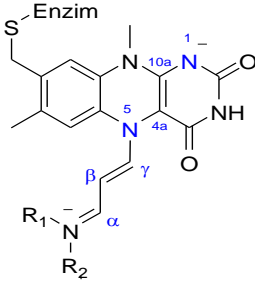
Odgovarajuće N5–C(γ), N5–C4a, i C4a–C(γ) udaljenosti iznose 1,465; 1,452 i 1,537 Å u slučaju SEL, odnosno 1,468; 1,454 te 1,530 Å kod RAS-a. Zanimljivo je da je reakcija koja daje SP3 više egzergona u slučaju RAS, dok je cjelokupni termodinamički profil povoljniji za SEL.

Zadnji korak uključuje pucanje veze između C(γ) inhibitora i C4a-atoma FAD-a te formiranje C(γ)–N5(FAD) veze kao što je prikazano u SP4. U TS3 (Slika 35.), veze koje nestaju su već dosta dugačke (1,929 Å za SEL te 1,820 Å za RAS), a proces je povezan s barijerama od 6,4 kcal mol⁻¹ za SEL ($\nu_{\text{imag}} = 305i$ cm⁻¹) i 5,4 kcal mol⁻¹ za RAS ($\nu_{\text{imag}} = 383i$ cm⁻¹), što ih čini energijski najmanje zahtjevnim prijelaznim stanjima tijekom cijelog termodinamičkog profila. Posljednji korak iznimno je egzergon te vodi do konačnog produkta. Kod RAS, dolazi do stabilizacije za 25,3 kcal mol⁻¹ do konačnog produkta ($\Delta G_r = -38,3$ kcal mol⁻¹), a stabilizacija je još izraženija kod SEL-a i iznosi 33,8 kcal mol⁻¹ ($\Delta G_r = -39,1$ kcal mol⁻¹).

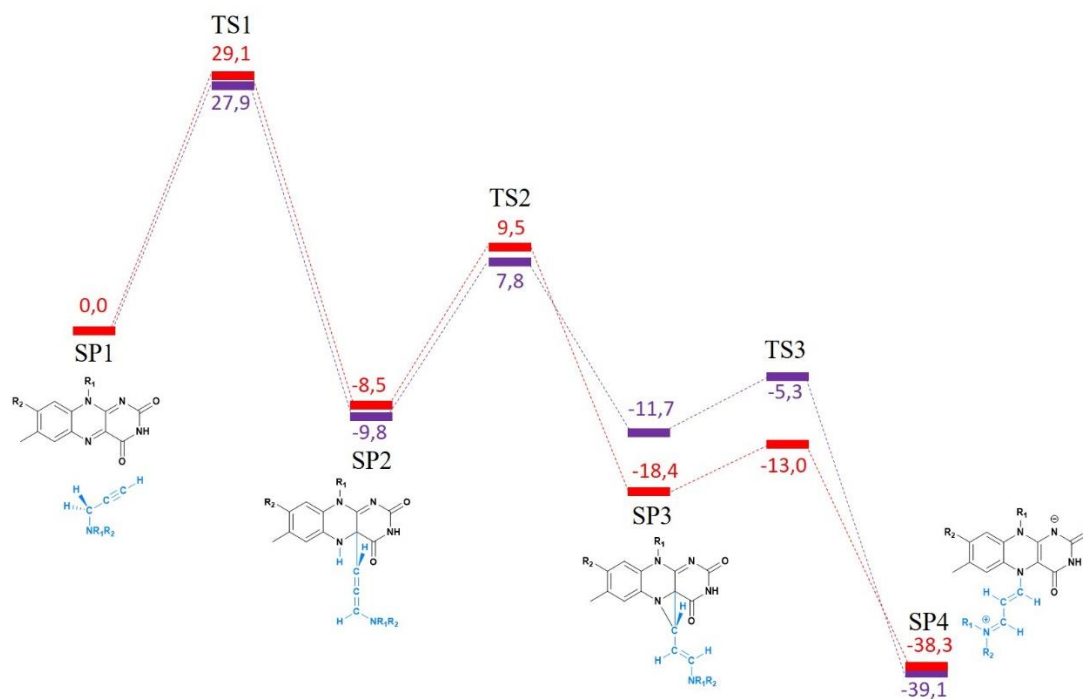
Elektronska struktura konačnog adukta SP4 (Slika 36.) uključuje pozitivni naboj delokaliziran unutar cijaninskog konjugiranog lanca.

Najviše pozitivnog naboja raspoređeno je na N(amino) i C(α) koji dobivaju po 0,18 i 0,49 |e| u odnosu na SP1, dok je veza koja ih povezuje skraćena za 0,05 Å. Konjugirani kostur također je potvrđen nedavnom analizom smanjene mogućnosti rotacije C–N odnosno C–C veze unutar modelnog sustava.²⁰⁵ Također, geometrija konačnog adukta je u jako dobrom slaganju s dostupnim rendgenskim difrakcijskim strukturama (Tablica 7.)^{54,193}

Tablica 7. Distribucija naboja (u |e| i odabranih duljina veza (u Å)) u N5(FAD) aduktu sa SEL i RAS.

				
Veza/atom	SEL adukt	2BYB.pdb ⁵⁴	RAS adukt	1S2Q.pdb ¹⁹³
N5–C(γ)	1,329	1,28	1,331	1,28
C(γ)–C(β)	1,387	1,33	1,383	1,29
C(β)–C(α)	1,389	1,52	1,394	1,53
C(α)–N(amino)	1,315	1,47	1,311	1,29
N5–C4a	1,420	1,39	1,419	1,38
C4a–C10a	1,404	1,41	1,389	1,39
C10a–N1	1,326	1,38	1,332	1,39
N5	–0,36		–0,36	
C(α)	0,14		0,13	
C(β)	–0,48		–0,44	
C(γ)	0,15		0,15	
N(amino)	–0,37		–0,56	
C4a	–0,14		–0,14	
C10a	0,47		0,46	
N1	–0,67		–0,71	

Zanimljivo je da u SP4, FAD sadrži anionski atom dušika N1 s izračunatim NBO nabojem od $-0,67 |e|$, što je u skladu s nedavno objavljenim rezultatima spektrometrije masa, koji sugeriraju da je N1 deprotoniran u aduktu i pri kiselim eksperimentalnim uvjetima ($\text{pH} \approx 2$).²⁰⁵

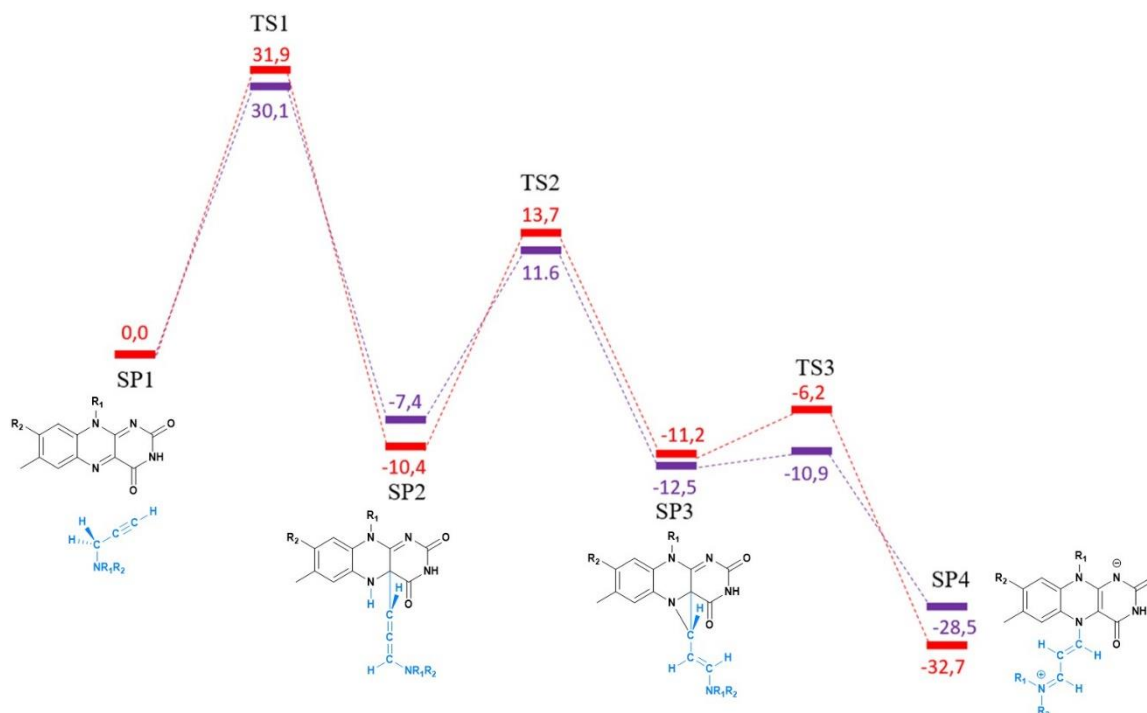


Slika 37. Profil slobodne Gibbsove energije izračunate na razini teorije (CPCM)/PBE0/6–311++G(2df,2pd)//(CPCM)/M06-2X/6–31+G(d,p) za ireverzibilnu inhibiciju MAO B enzima razagilinom (crveno) i selegilinom (ljubičasto) uz neutralni Lys296. Vrijednosti su izražene u kcal mol^{-1} .

Na kraju, važno je istaknuti da je opisani mehanizam (Slika 37.) povoljan i zbog činjenice da se odvija na način da je svaka sljedeća stacionarna točka energijski povoljnija od prethodne, uz iznimnu egzergonost. Korak koji određuje brzinu reakcije je apstrakcija hidridnog aniona. Također, predloženi mehanizam potvrđuje eksperimentalna opažanja da su RAS i SEL inhibitori koji su temeljeni na mehanizmu reakcije, dok dobiveni profili slobodne reakcijske Gibbsove energije ukazuju na nešto veću reaktivnost SEL-a u odnosu na RAS, s obzirom da SEL ima nižu barijeru prijelaza hidrida ($\Delta\Delta G^\ddagger = -1,2 \text{ kcal mol}^{-1}$) te izraženiju egzergonost reakcije ($\Delta\Delta G_r = -0,8 \text{ kcal mol}^{-1}$).

Kako bi se dodatno potvrdio navedeni zaključak, potrebno je spomenuti da je isključena mogućnost mehanizma prijenosa elektrona, u kojem dolazi do aktivacije inhibitora prijenosom

elektrona na FAD, što se donedavno smatralo katalitičkim mehanizmom katalize MAO enzima.⁴¹ Modeliranjem ovog procesa dobivene su sljedeće energije ionizacije: $IE(\text{SEL}) = 134,5 \text{ kcal mol}^{-1}$ i $IE(\text{RAS}) = 146,1 \text{ kcal mol}^{-1}$, koje su u raskoraku s izračunatim elektronskim afinitetom $EA(\text{FAD}) = -77,2 \text{ kcal mol}^{-1}$. Ovako velika neslaganja sugeriraju zaključak da ovakav proces nije vjerojatan pa se u budućnosti neće razmatrati.



Slika 38. Profil slobodne Gibbsove energije izračunate na razini teorije (CPCM)/PBE0/6–311++G(2df,2pd)//(CPCM)/M06-2X/6–31+G(d,p) za ireverzibilnu inhibiciju MAO B enzima razagilinom (crveno) i selegilinom (ljubičasto) uz pozitivno nabijeni Lys296. Vrijednosti su izražene u kcal mol^{-1} .

Dodatno su izračunati reakcijski profili u sustavu koji uključuje protonirani aminokiselinski ostatak Lys296 (Slika 38.), čije protonacijsko stanje je, kao što je ranije spomenuto, dvojbeno u literaturi.

Pokazano je da je reakcija u prisutnosti neutralnog Lys296 termodinamički i kinetički povoljnija, što je analogno kao kod katalitičke degradacije dopamina,⁹ Ovi rezultati navode na zaključak da taj aminokiselinski ostatak ima važnu ulogu u regeneraciji FADH_2 u FAD pomoću molekularnog kisika, no ne i u katalitičkoj transformaciji supstrata, odnosno u reakciji inhibicije, kao što je ranije pretpostavljano u literaturi.^{206,207}

4.3. EVB simulacije reakcije ireverzibilne inhibicije enzima MAO B propargilaminskim inhibitorima

4.3.1. Parametri EVB simulacija

Kao što je ranije spomenuto u literaturnom pregledu, EVB metoda omogućava izučavanje enzimskih reakcija uzimajući u obzir cijelu strukturu enzima. Glavna prednost ove metode mogućnost je opsežnog uzorkovanja konformacijskog prostora uz znatno manji utrošak računalnog vremena. Pri tome, izuzetno je bitno da su parametri koji opisuju promatranu kemijsku reakciju pažljivo odabrani. Prije ispitivanja katalitičke reakcije unutar enzima, sustav se kalibrira na standardne Gibbsove energije aktivacije (ΔG^\ddagger) i reakcije (ΔG_r) za referentnu reakciju.

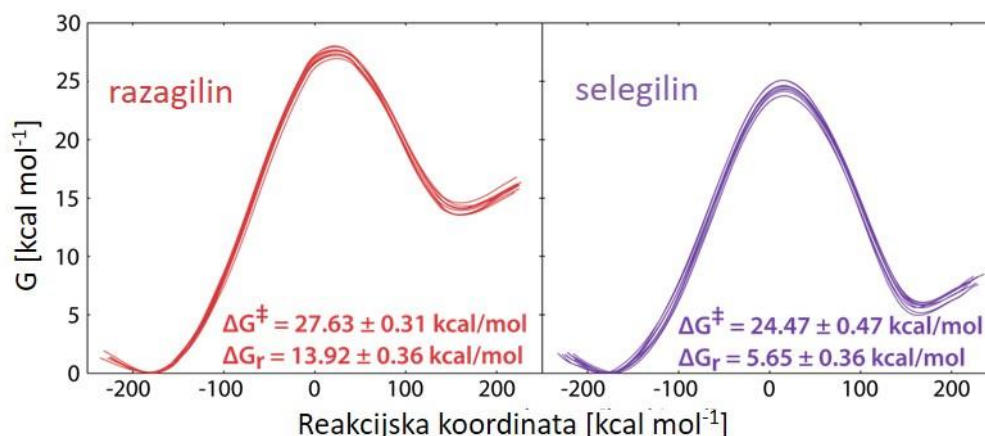
Tablica 8. Izračunate ΔG^\ddagger i ΔG_r za prijenos hidrida u reakciji propargilaminskih inhibitora RAS i SEL s lumiflavinom u vodi te EVB parametri izračunati iz FEP simulacija uz kalibraciju na izračunate QM vrijednosti.

supstrat	$\Delta G^\ddagger / \text{kcal mol}^{-1}$	$\Delta G_r / \text{kcal mol}^{-1}$	$H_{12} / \text{kcal mol}^{-1}$	$\alpha_2^0 / \text{kcal mol}^{-1}$
RAS	30,60	19,18	44,34	106,70
SEL	31,11	17,29	43,59	80,40

Pomoću izračunatih ΔG^\ddagger i ΔG_r kalibrirani su EVB parametri: H_{12} sprežujući parametar (engl. *coupling term*) i pomak (α_2^0) u potencijalnoj energiji između reaktanata i produkata. EVB parametri najčešće se dobivaju FEP simulacijama iste reakcije koja je prethodno provedena u plinskoj fazi, a čije su standardne Gibbsove energije aktivacije i reakcije jednake standardnim Gibbsovim energijama aktivacije i reakcije za referentnu reakciju. U ovom slučaju, kao referentna reakcija korištena je reakcija u vodenoj fazi. Izračunati parametri EVB simulacija (Tablici 8.) korišteni su za simulacije istih reakcija u enzimu.

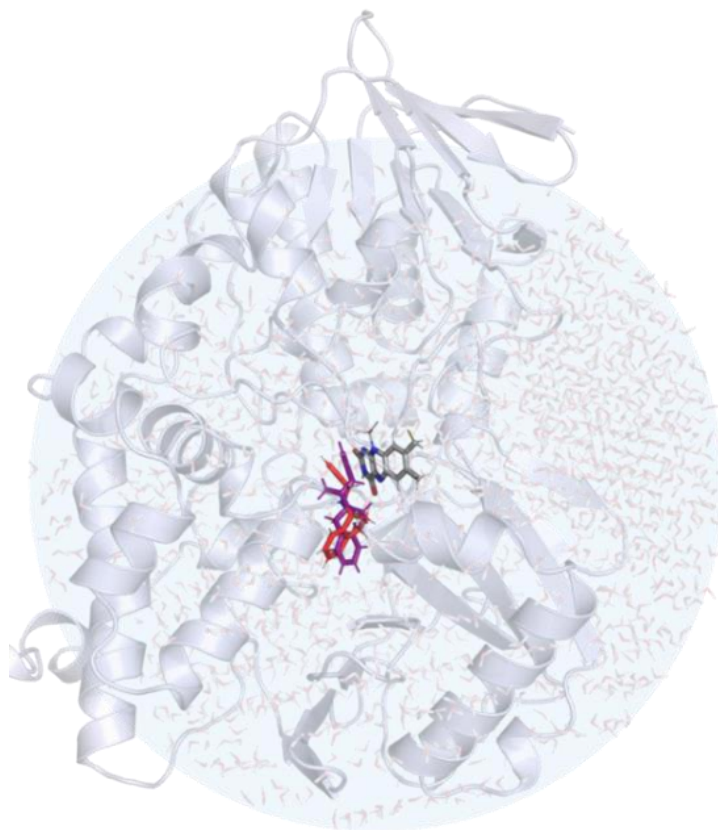
4.3.2. Rezultati EVB simulacija komercijalnih inhibitora

Reakcijski profili dobiveni EVB simulacijama reakcije unutar aktivnog mjesta MAO B prikazani su na Slici 31. S obzirom na to da se svaki profil sastoji od 10 pojedinačnih trajektorija, koji odgovaraju različitoj početnoj konfiguraciji inhibitora, sa sigurnošću se može zaključiti da provedene simulacije konvergiraju i ukazuju na iste zaključke.



Slika 39. EVB reakcijski profili reakcije apstrakcije hidrida za inhibitore razagilin (crveno) i selegilin (ljubičasto).

Izračunate aktivacijske energije $\Delta G^\ddagger(\text{RAS}) = 27,6 \text{ kcal mol}^{-1}$ i $\Delta G^\ddagger(\text{SEL}) = 24,5 \text{ kcal mol}^{-1}$, ukazuju na veću reaktivnost SEL-a, što se izvrsno slaže s rezultatima klasternog pristupa koji su prikazani u prethodnom poglavlju, kao i s eksperimentalno određenim konstantama brzine inhibicije koje iznose $0,99 \text{ min}^{-1}$ za SEL te $0,0533 \text{ min}^{-1}$ za RAS.^{6,204} Kada se eksperimentalni podaci preračunaju u razliku u slobodnoj aktivacijskoj energiji, koja iznosi $1,7 \text{ kcal mol}^{-1}$ u korist SEL-a, dobije se izvrsno slaganje s izračunatom razlikom $\Delta \Delta G^\ddagger = 3,1 \text{ kcal mol}^{-1}$ što dodatno potvrđuje naše rezultate. Također, izračunate vrijednosti ΔG_r pokazuju da je reakcija apstrakcije hidrida manje endergona u slučaju SEL-a ($\Delta G_r = 8,3 \text{ kcal mol}^{-1}$). Zanimljivo je da su izračunate vrijednosti ΔG_r termodinamički povoljnije od onih dobivenih u vodenom mediju (Tablica 8.), što pokazuje da je nabijeni međuprodukt koji nastaje nakon transfera H^- bolje stabiliziran unutar enzima nego u vodenom okolišu (Slika 39.), što je pojava koja je viđena kod nekoliko MAO supstrata.^{6,54,191,208} S druge strane, ako usporedimo reakcijske barijere između vodene otopine i enzimskog okruženja, vidimo da je za MAO B snižen ΔG^\ddagger za $2,97 \text{ kcal mol}^{-1}$ u slučaju RAS-a, odnosno $6,64 \text{ kcal mol}^{-1}$ u slučaju SEL u odnosu na istovrsnu reakciju u vodenom mediju (Slika 40.).



Slika 40. Struktura hidratirane podjedinice MAO B s RAS (crveno) i SEL (ljubičasto) u aktivnom mjestu enzima. FAD kofaktor prikazan je štapićastim prikazom.

Kada primijenimo teoriju prijelaznog stanja, odgovarajuće ubrzanje reakcije iznosi dva do pet redova veličine na sobnoj temperaturi. Ovaj podatak govori da je ista reakcija značajno ubrzana u enzimu ako je promatramo u odnosu na istu reakciju u vodi. Kako bi stavili ove brojeve u kontekst MAO B katalize, nužno je napomenuti da se u prethodnim radovima pokazalo da MAO B ubrzava katalizu prirodnih supstrata do devet redova veličine u odnosu na isti proces u vodi, što je u skladu s tim da je enzim evolucijski optimiziran za svoju fiziološku katalitičku ulogu, a ne za ireverzibilnu inhibiciju. Aktivno mjesto enzima povećava inhibitornu moć SEL u odnosu na RAS koja je u vodenom mediju manja (Tablica 8.).

Ponovno se uočava da je propargilaminska skupina ključna za ireverzibilnu prirodu ove klase inhibitora. U ovoj disertaciji promatra se samo prvi korak za kojeg je ustanovljeno da je korak koji određuje brzinu reakcije, što već daje korisne uvide za sintezu novih, potentnijih MAO B ireverzibilnih inhibitora.

4.3.3. Rezultati EVB simulacija derivata komercijalnih inhibitora

I u ovom slučaju provjerena je uloga metilne skupine na aminskom dušiku propargilaminskog inhibitora. Analogno proceduri za komercijalne inhibitore, provedene su simulacije za DSEL i MRAS, derivirane oblike komercijalnih inhibitora.

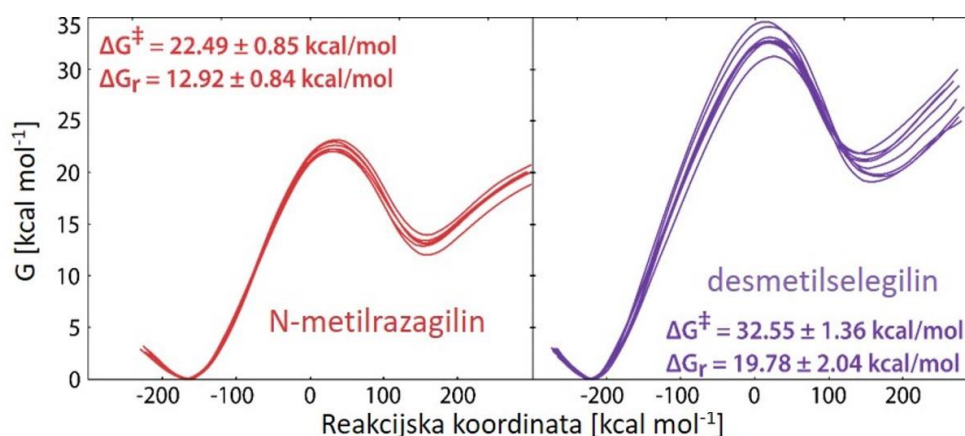
Pomoću ΔG^\ddagger i ΔG_r vrijednosti izračunatih QM metodologijom kalibrirani su EVB parametri, H_{12} sprežajući parametar i pomak (α_2^0) u potencijalnoj energiji između reaktanata i produkta koji su prikazani u Tablici 9.

Tablica 9. Izračunate ΔG^\ddagger i ΔG_r za prijenos hidrida u reakciji propargilaminskih inhibitora RAS i SEL s lumiflavinom u vodi te EVB parametri izračunati iz FEP simulacija uz kalibraciju na izračunate QM vrijednosti

supstrat	$\Delta G^\ddagger / \text{kcal mol}^{-1}$	$\Delta G_r / \text{kcal mol}^{-1}$	$H_{12} / \text{kcal mol}^{-1}$	$\alpha_2^0 / \text{kcal mol}^{-1}$
MRAS	28,79	13,27	57,92	112,43
DSEL	30,85	21,48	75,67	100,43

Reakcijski profili, dobiveni EVB simulacijama, za reakcije unutar aktivnog mjesta MAO B prikazani su na Slici 33.

Izračunate aktivacijske energije $\Delta G^\ddagger(\text{MRAS}) = 22,5 \text{ kcal mol}^{-1}$ i $\Delta G^\ddagger(\text{DSEL}) = 32,6 \text{ kcal mol}^{-1}$ ukazuju na veću reaktivnost MRAS, što doprinosi zaključku da terciarni amini izgledno imaju nižu kinetičku barijeru za apstrakciju hidrida.



Slika 41. EVB reakcijski profili apstrakcije hidrida za inhibitore *N*-metilrazagilin (crveno) i desmetilselegilin (ljubičasto).

U ovom slučaju, izračunate vrijednosti ΔG_r termodinamički su usporedive s onima dobivenima u vodenom mediju (Tablica 9.) te iznose $\Delta G_r(\text{MRAS}) = 12,9 \text{ kcal mol}^{-1}$ i $\Delta G_r(\text{DSEL}) = 19,8 \text{ kcal mol}^{-1}$. S druge strane, ako usporedimo reakcijske barijere između vodene otopine i enzimskog okruženja, vidimo da je MAO B snizio ΔG^\ddagger za $6,35 \text{ kcal mol}^{-1}$ u slučaju MRAS-a, dok u slučaju DSEL-a, barijera raste za $1,7 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Slika 41.), što ukazuje na to da je polarno prijelazno stanje DSEL-a manje stabilizirano u odnosu na vodenu otopinu. Ovakav rezultat ne iznenađuje, budući da DSEL kao metabolit SEL-a i eksperimentalno pokazuje slabiju inhibiciju MAO B enzima.¹⁹⁴

Dodatno, MRAS pokazuje najpovoljniji reakcijski profil od svih do sada proučavanih spojeva, što ga čini idealnim kandidatom za novi, potentniji MAO B inhibitor te se izrazito preporuča njegova eksperimentalna karakterizacija.

§ 5. ZAKLJUČAK

U ovoj disertaciji istražena je reakcija ireverzibilne inhibicije enzima MAO B s propargilaminskim inhibitorima, izuzetno bitnom skupinom lijekova u liječenju neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti.

Kombinacijom MD simulacija, izračunom MM-GBSA energije vezanja, QM klasternog modela i EVB simulacija utvrđen je precizan molekularni mehanizam inhibicije enzima MAO B komercijalnim inhibitorima, razagilinom (RAS) i selegilinom (SEL), te su objašnjena eksperimentalna opažanja o većoj reaktivnosti SEL u odnosu na RAS. Osim toga, identičan set simulacija proveden je i za *N*-metilrazagilin (MRAS) i desmetilselegilin (DSEL), derivate komercijalnih inhibitora, kako bi se ispitaio utjecaj metilne skupine na aminskom dušiku inhibitora.

Pokazano je da je inaktivacija MAO B enzima reakcija koja se odvija u tri koraka. U prvom koraku, koji ujedno i određuje brzinu reakcije, enzim pomoću N5 atoma na FAD kofaktoru vrši apstrakciju hidrida s C(α)-atoma inhibitora, što je u potpunom slaganju s katalitičkim mehanizmom ove klase enzima te dodatno potvrđuje činjenicu da su oba inhibitora tzv. inhibitori temeljeni na mehanizmu reakcije. Nakon inicijalne apstrakcije hidrida, stvara se adukt između C4a-atoma kofaktora i inhibitora, koji je transformiran tako da sadrži alenski motiv. Reakcija se nastavlja prijenosom N5 vodikovog atoma natrag na C(β)-atom inhibitora u obliku protona, uz nastajanje tročlanog prstena sastavljenog od C(γ)-atoma inhibitora i C4a-atoma i N5-atoma flavinskog prstena. U zadnjem koraku veza između C(γ)-atoma inhibitora te C4a flavina lako puca te se formira N5 adukt koji je u skladu s kristalografskim strukturama enzima MAO B inhibiranog propargilaminskim inhibitorima.

Dobiveni reakcijski profili su i termodinamički i kinetički povoljniji za SEL u odnosu na RAS, pa je tako razlika u izračunatim aktivacijskim energijama $\Delta\Delta G^\ddagger = -1,2 \text{ kcal mol}^{-1}$ u korist SEL, u izvrsnom slaganju s eksperimentalno određenom vrijednošću od $\Delta\Delta G^\ddagger = -1,7 \text{ kcal mol}^{-1}$. Usporedno s time, reakcija je u slučaju SEL više egzergona vidljivo u izračunatim reakcijskim Gibbsovim energijama od $\Delta\Delta G_r = -0,8 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Osim toga, potvrđeno je da na kemijsku reakciju unutar enzima utječu elektrostatske i hidrofobne interakcije s aminokiselinskim ostacima u aktivnom mjestu. Tako je pokazano da je

veća reaktivnost SEL-a dodatno podržana činjenicom da se SEL kao veća i fleksibilnija molekula bolje veže u aktivno mjesto nego RAS, pa izračunata energija vezanja za SEL iznosi $\Delta G_{\text{BIND}} = -30,83 \text{ kcal mol}^{-1}$, dok za RAS iznosi $\Delta G_{\text{BIND}} = -28,36 \text{ kcal mol}^{-1}$. Pokazano je da se tercijarni amini vežu u aktivno mjesto MAO B puno bolje od sekundarnih (MRAS se veže $5,72 \text{ kcal mol}^{-1}$ bolje od sekundarnog amina RAS-a, dok se DSEL veže $1,01 \text{ kcal mol}^{-1}$ lošije u odnosu na SEL). Energije vezanja u skladu su s dostupnim IC_{50} i K_i vrijednostima za ispitivane inhibitore. Ovi rezultati, kao i učestalost stvaranja vodikovih veza unutar aktivnog mjesta, ukazuju na to da su za vezanje u aktivno mjesto MAO B odgovorne uglavnom van der Waalsove interakcije s hidrofobnim aminokiselinama u aktivnom mjestu.

Vežanju inhibitora u aktivno mjesto enzima najviše doprinose interakcije s FAD-om, a osim toga, značajne interakcije ostvaruju se s Tyr435 i Tyr398, koji su dio hidrofobnog kaveza aktivnog mjesta MAO B. Osim toga, vrlo je značajna N–H $\cdots\pi$ interakcija aromatskog dijela inhibitora s amidnom skupinom Gln206, koja je iznenađujuće jedna od najdominantnijih u ukupnom vezanju propargilaminskih inhibitora.

EVB simulacijama potvrđena je veća reaktivnost SEL-a naspram RAS-a, a dobivene vrijednosti iznose $\Delta G^\ddagger(\text{RAS}) = 27,6 \text{ kcal mol}^{-1}$ i $\Delta G^\ddagger(\text{SEL}) = 24,5 \text{ kcal mol}^{-1}$, odnosno $\Delta G^\ddagger(\text{MRAS}) = 22,5 \text{ kcal mol}^{-1}$ i $\Delta G^\ddagger(\text{DSEL}) = 32,6 \text{ kcal mol}^{-1}$. Rezultati još jednom potvrđuju iznimnu važnost metilne skupine na aminskom dušiku propargilaminskih inhibitora, te potvrđuju tezu da su tercijarni amini bolji inhibitori u odnosu na sekundarne. Osim toga, MRAS daje najbolje rezultate od svih ispitivanih spojeva, pa predstavlja obećavajuću perspektivu u kreiranju novih, potentnijih MAO B inhibitora.

Dobiveni rezultati uvelike će unaprijediti razumijevanje klinički izuzetno bitne inhibicije MAO B enzima, što će pomoći u razvoju novih, farmakodinamički i farmakokinetički povoljnijih inhibitora, kao i općenitom razumijevanju funkcioniranja MAO enzima.

§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

Å	ångström, mjerna jedinica za duljinu; $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$
CC	teorija spregnutih grozdova (engl. <i>Coupled Cluster</i>)
CGTO	kontrahirani Gaussianski tip orbitala (engl. <i>Contracted Gaussian type orbital</i>)
CI	konfiguracijska interakcija (engl. <i>Configuration Interaction</i>)
COSMO	set parametara za opis solvatacije (engl. <i>Conductor-like Screening Model</i>)
CPCM	vodljiva metoda polarizabilnog kontinuuma (engl. <i>Conductor-like Polarizable Continuum Method</i>)
CYP	citokrom P450 superporodica enzima (engl. <i>Cytochrome P450</i>)
DFT	teorija funkcionala gustoće (engl. <i>Density Functional Theory</i>)
DSEL	desmetilselegilin
DZ	osnovni skup s dvostrukim brojem osnovnih funkcija (engl. <i>Double Zeta</i>)
DZP	osnovni skup s dvostrukim brojem osnovnih funkcija i jednim setom polarizacijskih funkcija (engl. <i>Double Zeta plus Polarization</i>)
EC	elektronska korelacija
EPR	elektronska paramagnetska rezonanca (engl. <i>electronic paramagnetic resonance</i>)
EVB	metoda za simuliranje enzimskih reakcija (engl. <i>Empirical Valence Bond</i>)
FAD	flavin-adenin-dinukleotid
FC	aproksimacija zamrznutih unutarnjih orbitala (engl. <i>frozen core</i>)
FDA	Američka agencija za hranu i lijekove (engl. <i>Food and Drug Administration</i>)
FMN	flavin-mononukleotid

GAFF	Generalizirano Amberovo polje sila polje sila (engl. <i>generalized Amber force field</i>)
GGA	aproksimacija generaliziranog gradijenta (engl. <i>Global Gradient Approximation</i>)
GTO	Gaussov tip orbitala (engl. <i>Gauss type orbitals</i>)
HF	Hartree-Fock metoda
IR	infracrvena spektroskopija (engl. <i>infrared spectroscopy</i>)
IRC	intrinzička reakcijska koordinata (engl. <i>Intrinsic Reaction Coordinate</i>)
KIE	kinetički izotopni efekt
LAO	oksidaza lijevih aminokiselina (engl. <i>left amino acid oxidase</i>)
LCAO	Linearna kombinacija atomskih orbitala (engl. <i>Linear Combination of Atomic Orbitals</i>)
LDA	aproksimacija lokalne gustoće (engl. <i>Local Density Approximation</i>)
LINCS	algoritam ograničavanja gibanja vodikovih atoma tijekom MD simulacija
LSDA	aproksimacija lokalne spinske gustoće (engl. <i>Local Spin Density Approximation</i>)
MAO	monoamin-oksidaza
MAO A	monoamin-oksidaza A
MAO B	monoamin-oksidaza B
MAOI	inhibitori monoamin-oksidaza
MBPT	perturbacijska teorija više tijela (engl. <i>Many-body Perturbation Theory</i>)
MD	molekulska dinamika, molekulsko-dinamički
meta-GGA	aproksimacija meta generaliziranog gradijenta (engl. <i>meta global gradient approximation</i>)

MM	molekulska mehanika
MM-PBSA	metoda za izračun slobodne energije (engl. <i>molecular mechanics – Poisson-Boltzmann surface area</i>)
MM-GBSA	metoda za izračun slobodne energije (engl. <i>molecular mechanics – Generalised-Born surface area</i>)
MRAS	<i>N</i> -metilrazagilin
NMR	nuklearna magnetska rezonancija (engl. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
NpT	izotermno-izobarni ansambl
NVE	mikrokanonski ansambl
NVT	kanonski ansambl
PAO	poliaminoksidaza
PB	Poisson-Boltzmann
PBC	periodični rubni uvjeti (engl. <i>Periodic Boundary Conditions</i>)
PCM	metoda polarizabilnog kontinuuma (engl. <i>Polarizable Continuum Method</i>)
PDB	baza eksperimentalno određenih struktura proteina (engl. <i>Protein Data Bank</i>)
PES	ploha potencijalne energije (engl. <i>Potential Energy Surface</i>)
PGTO	primitivni Gaussianski tip orbitala (engl. <i>Primitive Gaussian type Orbitals</i>)
PME	Ewaldova metoda za izračun elektrostatskih interakcija (engl. <i>Particle Mesh Ewald</i>)
QM	kvantna mehanika; kvantno-mehanički
QM/MM	kvantno-mehanički/molekulsko-mehanički
QZ	osnovni skup s četverostrukim brojem osnovnih funkcija (engl. <i>Quadruple Zeta</i>)
RAS	razagilin

RESP	parcijalni naboji u polju sila (engl. <i>restrained electrostatic potential</i>)
RMSD	korijen srednjeg kvadrata odstupanja (engl. <i>Root Mean Square Deviation</i>)
SASA	površina dostupna otapalu (engl. <i>Solvent Accessible Surface Area</i>)
SCF	metoda samousklađenog polja (engl. <i>Self-Consistent Field Method</i>)
SEL	selegilin
SHAKE	algoritam ograničavanja gibanja vodikovih atoma tijekom MD simulacija
SMD	set parametara za opis solvatacije (engl. <i>solute molecule density</i>)
SSRI	selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina (engl. <i>serotonin selective reuptake inhibitor</i>)
STO	orbitala Slaterovog tipa (engl. <i>Slater type orbital</i>)
TCA	triciklički antidepresivi (engl. <i>tricyclic antidepressant</i>)
TIPnP	modeli molekula vode u kojima su duljine veza i kutovi fiksirani, a elektrostatske interakcije definirane preko n točkastih naboja (engl. <i>transferrable intermolecular potential n-point</i>)
TS	prijelazno stanje (engl. <i>transition state</i>)
TZ	osnovni skup s trostrukim brojem osnovnih funkcija (engl. <i>Triple Zeta</i>)
TZ2P	osnovni skup s trostrukim brojem osnovnih funkcija i dva seta polarizacijskih funkcija (engl. <i>Triple Zeta plus Double Polarization</i>)
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organization</i>)

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. M. L. C. Hare, *Biochem. J.* **22** (1928) 968–979.
2. J. C. Shih, K. Chen, i M. J. Ridd, *Annu. Rev. Neurosci.* **22** (1999) 197–217.
3. K. Westlund, R. Denney, L. Kochersperger, R. Rose, i C. Abell, *Science (80-.)*. **230** (1985) 181–183.
4. E. R. Dorsey, A. Elbaz, E. Nichols, F. Abd-Allah, A. Abdelalim, J. C. Adsuar, M. G. Ansha, C. Brayne, J.-Y. J. Choi, D. Collado-Mateo, N. Dahodwala, H. P. Do, D. Edessa, M. Endres, S.-M. Fereshtehnejad, K. J. Foreman, F. G. Gankpe, R. Gupta, G. J. Hankey, S. I. Hay, M. I. Hegazy, D. T. Hibstu, A. Kasaeian, Y. Khader, I. Khalil, Y.-H. Khang, Y. J. Kim, Y. Kokubo, G. Logroscino, J. Massano, N. Mohamed Ibrahim, M. A. Mohammed, A. Mohammadi, M. Moradi-Lakeh, M. Naghavi, B. T. Nguyen, Y. L. Nirayo, F. A. Ogbo, M. O. Owolabi, D. M. Pereira, M. J. Postma, M. Qorbani, M. A. Rahman, K. T. Roba, H. Safari, S. Safiri, M. Satpathy, M. Sawhney, A. Shafieesabet, M. S. Shiferaw, M. Smith, C. E. I. Szoeki, R. Tabarés-Seisdedos, N. T. Truong, K. N. Ukwaja, N. Venketasubramanian, S. Villafaina, K. gidey Weldegwergs, R. Westerman, T. Wijeratne, A. S. Winkler, B. T. Xuan, N. Yonemoto, V. L. Feigin, T. Vos, i C. J. L. Murray, *Lancet Neurol.* **17** (2018) 939–953.
5. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia> (pristupljeno 21. siječnja 2019.)
6. R. R. Ramsay, i A. Albrecht, *J. Neural Transm.* **125** (2018) 1659–1683.
7. M. Youdim, i M. Weinstock, *Neurotoxicology* **25** (2004) 243–250.
8. J. T. Seaman, i J. T. Landry, Mylan: 50 Years of Unconventional Success: Making Quality Medicine Affordable and Accessible. (University Press of New England, Lebanon, New Hampshire, SAD, 2011).
9. R. Vianello, M. Repič, i J. Mavri, *European J. Org. Chem.* **2012** (2012) 7057–7065.
10. E. M. Milczek, C. Binda, S. Rovida, A. Mattevi, i D. E. Edmondson, *FEBS J.* **278** (2011) 4860–4869.
11. F. Hubálek, C. Binda, A. Khalil, M. Li, A. Mattevi, N. Castagnoli, i D. E. Edmondson, *J. Biol. Chem.* **280** (2005) 15761–15766.
12. S. Dasgupta, S. Mukherjee, B. P. Mukhopadhyay, A. Banerjee, i D. K. Mishra, *J. Biomol.*

- Struct. Dyn.* **36** (2018) 1439–1462.
13. E. Coelho Cerqueira, P. A. Netz, C. Diniz, V. Petry do Canto, i C. Follmer, *Bioorg. Med. Chem.* **19** (2011) 7416–7424.
 14. W.-D. Lienhart, V. Gudipati, i P. Macheroux, *Arch. Biochem. Biophys.* **535** (2013) 150–162.
 15. I. Hanukoglu, *J. Mol. Evol.* **85** (2017) 205–218.
 16. L. B. Bailey, i J. F. Gregory, *J. Nutr.* **129** (1999) 779–782.
 17. N. Pivac, J. Knezevic, D. Kozaric-Kovacic, M. Dezeljin, M. Mustapic, D. Rak, T. Matijevic, J. Pavelic, i D. Muck-Seler, *J. Affect. Disord.* **103** (2007) 131–138.
 18. L. Du, D. Bakish, A. Ravindran, i P. D. Hrdina, *Neuroreport* **15** (2004) 2097–2101.
 19. M. Nikolac Perkovic, D. Svob Strac, G. Nedic Erjavec, S. Uzun, J. Podobnik, O. Kozumplik, S. Vlatkovic, i N. Pivac, *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* **69** (2016) 131–146.
 20. R. Valdes-Ramos, G.-L. Laura, M.-C. Elina, i B.-A. Donaji, *Endocrine, Metab. Immune Disord. Targets* **15** (2015) 54–63.
 21. T. Udhayabanu, A. Manole, M. Rajeshwari, P. Varalakshmi, H. Houlden, i B. Ashokkumar, *J. Clin. Med.* **6** (2017) 52.
 22. P. Tavladoraki, M. E. Schininà, F. Cecconi, S. Di Agostino, F. Manera, G. Rea, P. Mariottini, R. Federico, i R. Angelini, *FEBS Lett.* **426** (1998) 62–66.
 23. R. R. Ramsay, *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* **69** (2016) 81–89.
 24. R. R. Ramsay, *Curr. Top. Med. Chem.* **12** (2012) 2189–2209.
 25. D. E. Edmondson, A. Mattevi, C. Binda, M. Li, i F. Hubalek, *Curr. Med. Chem.* **11** (2004) 1983–1993.
 26. J. P. M. Finberg, i J. M. Rabey, *Front. Pharmacol.* **7** (2016).
 27. N. C. Lan, C. Heinzmann, A. Gal, I. Klisak, U. Orth, E. Lai, J. Grimsby, R. S. Sparkes, T. Mohandas, i J. C. Shih, *Genomics* **4** (1989) 552–559.
 28. O. Cases, I. Seif, J. Grimsby, P. Gaspar, K. Chen, S. Pournin, U. Müller, M. Aguet, C. Babinet, i J. C. Shih, *Science* **268** (1995) 1763–6.
 29. J. Grimsby, M. Toth, K. Chen, T. Kumazawa, L. Klaidman, J. D. Adams, F. Karoum, J. Gal, i J. C. Shih, *Nat. Genet.* **17** (1997) 206–210.
 30. A. S. Kalgutkar, D. K. Dalvie, N. Castagnoli, i T. J. Taylor, *Chem. Res. Toxicol.* **14** (2001) 1139–1162.

31. J. S. Fowler, J. Logan, E. Shumay, N. Alia-Klein, G.-J. Wang, i N. D. Volkow, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **58** (2015) 51–64.
32. F. Rendu, K. Peoc'h, I. Berlin, D. Thomas, i J.-M. Launay, *Int. J. Environ. Res. Public Health* **8** (2011) 136–147.
33. V. V. Ruchkin, R. A. Koposov, B. af Klinteberg, L. Orelund, i E. L. Grigorenko, *J. Abnorm. Psychol.* **114** (2005) 477–482.
34. A. Nicotra, F. Pierruci, H. Parvez, i O. Senatori, *Neurotoxicology* **25** (2004) 155–165.
35. R. M. Geha, K. Chen, J. Wouters, F. Ooms, i J. C. Shih, *J. Biol. Chem.* **277** (2002) 17209–17216.
36. M. Li, C. Binda, A. Mattevi, i D. E. Edmondson, *Biochemistry* **45** (2006) 4775–4784.
37. M. H. Hefti, J. Vervoort, i W. J. H. Van Berkel, *Eur. J. Biochem.* **270** (2003) 4227–4242.
38. X. Lu, H. Ji, and R. B. Silverman, in: *Flavins and Flavoproteins*, S. Chapman, R. Perham, i N. S. Scrutton (eds.): (University Park Press, Baltimore, MD, 2002), pp. 817–830.
39. M. C. Walker, i D. E. Edmondson, *Biochemistry* **33** (1994) 7088–7098.
40. P. H. Yu, B. A. Bailey, D. A. Durden, i A. A. Boulton, *Biochem. Pharmacol.* **35** (1986) 1027–1036.
41. R. B. Silverman, *Acc. Chem. Res.* **28** (1995) 335–342.
42. R. B. Silverman, X. Lu, J. J. P. Zhou, i A. Swihart, *J. Am. Chem. Soc.* **116** (1994) 11590–11591.
43. A. P. B. Vintém, N. T. Price, R. B. Silverman, i R. R. Ramsay, *Bioorg. Med. Chem.* **13** (2005) 3487–3495.
44. R. B. Silverman, *J. Biol. Chem.* **258** (1983) 14766–9.
45. D. E. Edmondson, C. Binda, J. Wang, A. K. Upadhyay, i A. Mattevi, *Biochemistry* **48** (2009) 4220–4230.
46. D. E. Edmondson, C. Binda, i A. Mattevi, *Arch. Biochem. Biophys.* **464** (2007) 269–76.
47. A. Tan, M. D. Glantz, L. H. Piette, i K. T. Yasunobu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **117** (1983) 517–523.
48. R. K. Nandigama, i D. E. Edmondson, *Biochemistry* **39** (2000) 15258–15265.
49. J. R. Miller, D. E. Edmondson, i C. B. Grissom, *J. Am. Chem. Soc.* **117** (1995) 7830–7831.
50. J. R. Miller, i D. E. Edmondson, *Biochemistry* **38** (1999) 13670–13683.
51. S. S. Erdem, Ö. Karahan, İ. Yıldız, i K. Yelekçi, *Org. Biomol. Chem.* **4** (2006) 646.
52. J. Smith, i M. March, *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms i*

- Structure, 5th ed. (Wiley, New Jersey, 2001).
53. C. Binda, M. Li, F. Hubalek, N. Restelli, D. E. Edmondson, i A. Mattevi, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100** (2003) 9750–9755.
 54. L. De Colibus, M. Li, C. Binda, A. Lustig, D. E. Edmondson, i A. Mattevi, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102** (2005) 12684–12689.
 55. R. Vianello, i J. Mavri, in: *Theory Appl. Empir. Val. Bond Approach from Phys. Chem. to Chem. Biol.*: (Jon Wiley & Sons, Chichester, 2017), pp. 199–231.
 56. M. Repič, R. Vianello, M. Purg, F. Duarte, P. Bauer, S. C. L. Kamerlin, i J. Mavri, *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **82** (2014) 3347–3355.
 57. J. Mavri, R. A. Matute, Z. T. Chu, i R. Vianello, *J. Phys. Chem. B* **120** (2016) 3488–3492.
 58. A. Pletscher, *Experientia* **47** (1991) 4–8.
 59. S. Carradori, i R. Silvestri, *J. Med. Chem.* **58** (2015) 6717–6732.
 60. M. Naoi, W. Maruyama, i M. Shamoto-Nagai, *J. Neural Transm.* **127** (2020) 131–147.
 61. M. B. H. Youdim, D. Edmondson, i K. F. Tipton, *Nat. Rev. Neurosci.* **7** (2006) 295–309.
 62. L. Culpepper, *Prim. Care Companion CNS Disord.* (2013).
 63. J. Buigues, i J. Vallejo, *J. Clin. Psychiatry* **48** (1987) 55–9.
 64. R. Rothschild, H. M. Quitkin, F. M. Quitkin, J. W. Stewart, K. Ocepek-Welikson, P. J. McGrath, i E. Tricamo, *Int. J. Eat. Disord.* **15** (1994) 1–9.
 65. M. R. Liebowitz, F. Schneier, R. Campeas, E. Hollander, J. Hatterer, A. Fyer, J. Gorman, L. Papp, S. Davies, R. Gully, i D. F. Klein, *Arch. Gen. Psychiatry* **49** (1992) 290.
 66. P. H. Soloff, J. Cornelius, A. George, S. Nathan, J. M. Perel, i R. F. Ulrich, *Arch. Gen. Psychiatry* **50** (1993) 377–85.
 67. D. Healy, *The Antidepressant Era* (Harvard University Press, Cambridge, 1999).
 68. H. P. LOOMER, J. C. SAUNDERS, i N. S. KLINE, *Psychiatr. Res. Rep. Am. Psychiatr. Assoc.* **8** (1957) 129–41.
 69. E. Jacobsen, *Psychopharmacology (Berl)*. **89** (1986) 138–144.
 70. F. J. Ayd, *Neuropsychopharmacology* **5** (1991) 71–84.
 71. L. REES, *Nature* **186** (1960) 114–120.
 72. M. C. Anderson, F. Hasan, J. M. McCrodden, i K. F. Tipton, *Neurochem. Res.* **18** (1993) 1145–1149.
 73. R. M. Atkinson, i K. S. Ditman, *Clin. Pharmacol. Ther.* **6** (1965) 631–655.
 74. M. B. Youdim, i J. P. Finberg, *J. Neural Transm. Suppl.* **25** (1987) 27–33.

75. T. Tábi, L. Vécsei, M. B. Youdim, P. Riederer, i É. Szökő, *J. Neural Transm.* **127** (2020) 831–842.
76. J. Knoll, Z. Ecséri, K. Kelemen, J. Nievel, i B. Knoll, *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **155** (1965) 154–64.
77. K. Magyar, E. S. Vizi, Z. Ecséri, i J. Knoll, *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* **32** (1967) 377–87.
78. K. Magyar, in: (2011), pp. 65–84.
79. W. Birkmayer, P. Riederer, M. B. H. Youdim, i W. Linauer, *J. Neural Transm.* **36** (1975) 303–326.
80. J. E. Frampton, i G. L. Plosker, *CNS Drugs* **21** (2007) 521–524.
81. J. S. Barrett, P. Szego, S. Rohatagi, R. J. Morales, K. E. De Witt, G. Rajewski, i J. Ireland, *Pharm. Res.* **13** (1996) 1535–40.
82. M. Gerlach, M. B. H. Youdim, i P. Riederer, *Neurology* **47** (1996) 137S-145S.
83. J. S. Fowler, J. Logan, N. D. Volkow, E. Shumay, F. McCall-Perez, M. Jayne, G.-J. Wang, D. L. Alexoff, K. Apelskog-Torres, B. Hubbard, P. Carter, P. King, S. Fahn, M. Gilmor, F. Telang, C. Shea, Y. Xu, i L. Muench, *Neuropsychopharmacology* **40** (2015) 650–657.
84. H. Kalász, K. Tekes, E. B. Faigl, Z. Pöstényi, E. Berekméri, G. Karvaly, i E. Adeghate, *Open Med. Chem. J.* **11** (2017) 1–8.
85. T. George, i A. Weinberger, *Clin. Pharmacol. Ther.* **83** (2008) 619–621.
86. J.-L. Montastruc, C. Chaumerliac, K. Desboeuf, M. Manika, H. Bagheri, O. Rascol, i M. Lapeyre-Mestre, *Clin. Neuropharmacol.* **23** (2000) 271–275.
87. J. P. M. Finberg, I. Lamensdorf, J. W. Commissiong, i M. B. H. Youdim, in: *Deprenyl — Past Futur.:* (Springer Vienna, Vienna, 1996), pp. 95–101.
88. J. P. M. Finberg, *J. Neural Transm.* **127** (2020) 125–130.
89. J. J. Chen, i D. M. Swope, *J. Clin. Pharmacol.* **45** (2005) 878–894.
90. A. Schapira, G. Bate, i P. Kirkpatrick, *Nat. Rev. Drug Discov.* **4** (2005) 625–6.
91. A. Szabo, i N. S. Ostlund, *Modern Quantum Chemistry* (Dover Publication Inc, Mineola, New York, 1996).
92. P. Atkins, i R. Friedman, *Molecular Quantum Mechanics* (Oxford University Press, Oxford, 2005).
93. F. Jensen, *Introduction to Computational Chemistry* (John Wiley & Sons, New Jersey, 2006).

94. S. H. Vosko, L. Wilk, i M. Nusair, *Can. J. Phys.* **58** (1980) 1200–1211.
95. J. R. Cheeseman, G. W. Trucks, T. A. Keith, i M. J. Frisch, *J. Chem. Phys.* **104** (1996) 5497–5509.
96. A. D. Becke, *Phys. Rev. A* **38** (1988) 3098–3100.
97. C. Lee, W. Yang, i R. G. Parr, *Phys. Rev. B* **37** (1988) 785–789.
98. J. P. Perdew, J. A. Chevary, S. H. Vosko, K. A. Jackson, M. R. Pederson, D. J. Singh, i C. Fiolhais, *Phys. Rev. B* **46** (1992) 6671–6687.
99. A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **98** (1993) 5648–5652.
100. J. P. Perdew, *Electronic Structure of Solids* (Akademie Verlag, Berlin, 1991).
101. J. P. Perdew, K. Burke, i M. Ernzerhof, *Phys. Rev. Lett.* **78** (1997) 1396–1396.
102. J. P. Perdew, K. Burke, i M. Ernzerhof, *Phys. Rev. Lett.* **77** (1996) 3865–3868.
103. A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **104** (1996) 1040–1046.
104. J. Rey, i A. Savin, *Int. J. Quantum Chem.* **69** (1998) 581–590.
105. J. P. Perdew, S. Kurth, A. Zupan, i P. Blaha, *Phys. Rev. Lett.* **82** (1999) 2544–2547.
106. J. P. Perdew, S. Kurth, A. Zupan, i P. Blaha, *Phys. Rev. Lett.* **82** (1999) 5179–5179.
107. A. D. Boese, i N. C. Handy, *J. Chem. Phys.* **116** (2002) 9559–9569.
108. J. Tao, J. P. Perdew, V. N. Staroverov, i G. E. Scuseria, *Phys. Rev. Lett.* **91** (2003) 146401.
109. T. Van Voorhis, i G. E. Scuseria, *J. Chem. Phys.* **109** (1998) 400–410.
110. Y. Zhao, N. E. Schultz, i D. G. Truhlar, *J. Chem. Phys.* **123** (2005) 161103.
111. Y. Zhao, N. E. Schultz, i D. G. Truhlar, *J. Chem. Theory Comput.* **2** (2006) 364–382.
112. Y. Zhao, i D. G. Truhlar, *Theor. Chem. Acc.* **120** (2008) 215–241.
113. R. Ditchfield, W. J. Hehre, i J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* **54** (1971) 724–728.
114. T. H. Dunning, *J. Chem. Phys.* **90** (1989) 1007–1023.
115. S. Huzinaga, J. Andzelm, M. Klobukowski, E. Radzio-Andzelm, Y. Sakai, i H. Tatewaki, *Gaussian Basis Sets for Molecular Calculations* (Elsevier, Amsterdam, 1984).
116. A. Schäfer, C. Huber, i R. Ahlrichs, *J. Chem. Phys.* **100** (1994) 5829–5835.
117. J. Almlöf, i P. R. Taylor, in: (1991), pp. 301–373.
118. M. Toma, L. Božičević, J. Lapić, S. Djaković, D. Šakić, T. Tandarić, R. Vianello, i V. Vrček, *J. Org. Chem.* **84** (2019) 12471–12480.
119. D. Šakić, P. Šonjić, T. Tandarić, i V. Vrček, *J. Phys. Chem. A* **118** (2014).
120. T. Tandarić, V. Vrček, i D. Šakić, *Org. Biomol. Chem.* **14** (2016).
121. G. Scalmani, i M. J. Frisch, *J. Chem. Phys.* **132** (2010) 114110.

122. V. Barone, i M. Cossi, *J. Phys. Chem. A* **102** (1998) 1995–2001.
123. A. V. Marenich, C. J. Cramer, i D. G. Truhlar, *J. Phys. Chem. B* **113** (2009) 6378–6396.
124. J. Ho, i M. L. Coote, *Theor. Chem. Acc.* **125** (2010) 3–21.
125. J. R. Pliego, *Chem. Phys.* **306** (2004) 273–280.
126. M. Chaichian, i A. Demichev, *Path Integrals in Physics Volume 1: Stochastic Process i Quantum Mechanics* (Taylor & Francis, Milton Park, Abingdon, 2001).
127. Y. Saad, *Iterative Methods for Sparse Linear Systems*, 2nd ed. (Society for Industrial i Applied Mathematics, Philadelphia, 2003).
128. K. E. Atkinson, *An Introduction to Numerical Analysis* (John Wiley & Sons, New Jersey, 1989).
129. C. G. Broyden, *Math. Comput.* **19** (1965) 577–577.
130. K. Fukui, *Acc. Chem. Res.* **14** (1981) 363–368.
131. H. P. Hratchian, i H. B. Schlegel, *J. Chem. Theory Comput.* **1** (2005) 61–69.
132. C. Micheletti, J. R. Banavar, i A. Maritan, *Phys. Rev. Lett.* **87** (2001) 088102.
133. Y. M. Huang, W. Chen, M. J. Potter, i C. A. Chang, *Biophys. J.* **103** (2012) 342–351.
134. D. P. Kroese, T. Brereton, T. Taimre, i Z. I. Botev, *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.* **6** (2014) 386–392.
135. L. Verlet, *Phys. Rev.* **159** (1967) 98–103.
136. C. K. Birdsall, i A. . Langdon, *Plasma Physics via Computer Simulation* (CRC Press, 2018).
137. H. Ode, M. Nakashima, S. Kitamura, W. Sugiura, i H. Sato, *Front. Microbiol.* **3** (2012).
138. J.-P. Ryckaert, G. Ciccotti, i H. J. . Berendsen, *J. Comput. Phys.* **23** (1977) 327–341.
139. B. Hess, H. Bekker, H. J. C. Berendsen, i J. G. E. M. Fraaije, *J. Comput. Chem.* **18** (1997) 1463–1472.
140. M. W. Mahoney, i W. L. Jorgensen, *J. Chem. Phys.* **112** (2000) 8910–8922.
141. P. Florová, P. Sklenovský, P. Banáš, i M. Otyepka, *J. Chem. Theory Comput.* **6** (2010) 3569–3579.
142. S. Le Roux, *Étude Par Dynamique Moléculaire Ab-Initio Des Verres de Chalcogénures GeS₂ et (M₂S) 0.33 (GeS₂) 0.66 M= Na, Ag*, Université Montpellier II-Sciences et Techniques du Languedoc, 2008.
143. H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, i J. R. Haak, *J. Chem. Phys.* **81** (1984) 3684–3690.

144. T. Schlick, *Molecular Modeling i Simulation: An Interdisciplinary Guide* (Springer New York, New York, NY, 2010).
145. P. P. Ewald, *Ann. Phys.* **369** (1921) 253–287.
146. H. D. Herce, A. E. Garcia, i T. Darden, *J. Chem. Phys.* **126** (2007) 124106.
147. M. Di Pierro, R. Elber, i B. Leimkuhler, *J. Chem. Theory Comput.* **11** (2015) 5624–5637.
148. S. Genheden, i U. Ryde, *Expert Opin. Drug Discov.* **10** (2015) 449–461.
149. P. A. Kollman, I. Massova, C. Reyes, B. Kuhn, S. Huo, L. Chong, M. Lee, T. Lee, Y. Duan, W. Wang, O. Donini, P. Cieplak, J. Srinivasan, D. A. Case, i T. E. Cheatham, *Acc. Chem. Res.* **33** (2000) 889–897.
150. B. R. Miller, T. D. McGee, J. M. Swails, N. Homeyer, H. Gohlke, i A. E. Roitberg, *J. Chem. Theory Comput.* **8** (2012) 3314–3321.
151. H. Sun, L. Duan, F. Chen, H. Liu, Z. Wang, P. Pan, F. Zhu, J. Z. H. Zhang, i T. Hou, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20** (2018) 14450–14460.
152. P. E. M. Siegbahn, i F. Himo, *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **14** (2009) 643–651.
153. T. S. Hofer, i S. P. de Visser, *Front. Chem.* **6** (2018).
154. S. C. L. Kamerlin, i A. Warshel, *Faraday Discuss.* **145** (2010) 71–106.
155. F. Himo, *Theor. Chem. Acc.* **116** (2006) 232–240.
156. M. J. Ramos, i P. A. Fernandes, *Acc. Chem. Res.* **41** (2008) 689–698.
157. P. E. M. Siegbahn, i F. Himo, *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **1** (2011) 323–336.
158. K. M. Merz, *Acc. Chem. Res.* **47** (2014) 2804–2811.
159. M. Prejanò, T. Marino, i N. Russo, *Front. Chem.* **6** (2018).
160. A. Maršavelski, i R. Vianello, *Chem. - A Eur. J.* **23** (2017) 2915–2925.
161. U. Ryde, *J. Chem. Theory Comput.* **13** (2017) 5745–5752.
162. F. Duarte, i S. C. L. Kamerlin (eds.), *Theory i Applications of the Empirical Valence Bond Approach* (John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2017).
163. S. Shaik, i P. C. Hiberty, *A Chemist's Guide to Valence Bond Theory* (John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2007).
164. A. Warshel, i R. M. Weiss, *J. Am. Chem. Soc.* **102** (1980) 6218–6226.
165. J. Åqvist, i A. Warshel, *Chem. Rev.* **93** (1993) 2523–2544.
166. G. Hong, E. Rosta, i A. Warshel, *J. Phys. Chem. B* **110** (2006) 19570–19574.
167. M. Purg, i S. C. L. Kamerlin, in: (2018), pp. 3–51.

168. C. Binda, F. Hubálek, M. Li, Y. Herzig, J. Sterling, D. E. Edmondson, i A. Mattevi, *J. Med. Chem.* **48** (2005) 8148–8154.
169. M. H. M. Olsson, C. R. Søndergaard, M. Rostkowski, i J. H. Jensen, *J. Chem. Theory Comput.* **7** (2011) 525–537.
170. M. Rostkowski, M. H. Olsson, C. R. Søndergaard, i J. H. Jensen, *BMC Struct. Biol.* **11** (2011) 6.
171. D. A. Case, R. M. Betz, D. S. Cerutti, T. A. Cheatham, T. E. III. Darden, R. E. Duke, T. J. Giese, H. Gohlke, A. W. Goetz, N. Homeyer, S. Izadi, P. Janowski, J. Kaus, A. Kovalenko, T. S. Lee, S. LeGrand, P. Li, C. Lin, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, D. Mermelstein, K. M. Merz, G. Monard, H. Nguyen, H. T. Nguyen, I. Omelyan, A. Onufriev, D. R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, C. L. Simmerling, W. M. Botello-Smith, J. Swails, R. C. Walker, J. Wang, R. M. Wolf, X. Wu, L. Xiao, i K. P.A., (2016).
172. T. Darden, D. York, i L. Pedersen, *J. Chem. Phys.* **98** (1993) 10089–10092.
173. G. M. Keserü, i D. C. Swinney (eds.), *Thermodynamics i Kinetics of Drug Binding* (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2015).
174. T. Hou, J. Wang, Y. Li, i W. Wang, *J. Chem. Inf. Model.* **51** (2011) 69–82.
175. M. Repič, M. Purg, R. Vianello, i J. Mavri, *J. Phys. Chem. B* **118** (2014) 4326–4332.
176. R. Vianello, C. Domene, i J. Mavri, *Front. Neurosci.* **10** (2016).
177. C. Binda, P. Newton-Vinson, F. Hubálek, D. E. Edmondson, i A. Mattevi, *Nat. Struct. Biol.* **9** (2002) 22–26.
178. W. Humphrey, A. Dalke, i K. Schulten, *J. Mol. Graph.* **14** (1996) 33–38.
179. E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, i T. E. Ferrin, *J. Comput. Chem.* **25** (2004) 1605–1612.
180. P. Bauer, A. Barrozo, M. Purg, B. A. Amrein, M. Esguerra, P. B. Wilson, D. T. Major, J. Åqvist, i S. C. L. Kamerlin, *SoftwareX* **7** (2018) 388–395.
181. M. Poberžnik, M. Purg, M. Repič, J. Mavri, i R. Vianello, *J. Phys. Chem. B* **120** (2016) 11419–11427.
182. Gaussian09, AM. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, H. Petersson, G. A. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J.

- Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Had, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brother, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman, i D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.
183. W. J. Geldenhuys, K. S. Ko, H. Stinnett, C. J. Van der Schyf, i M. H. Lim, *Medchemcomm* **2** (2011) 1099.
184. M. Toprakçı, i K. Yelekçi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15** (2005) 4438–4446.
185. M. Tavari, S. F. Malan, i J. Joubert, *Medchemcomm* **7** (2016) 1628–1639.
186. Y. Li, X. Qiang, L. Luo, Y. Li, G. Xiao, Z. Tan, i Y. Deng, *Bioorg. Med. Chem.* **24** (2016) 2342–2351.
187. Y. Li, X. Qiang, L. Luo, X. Yang, G. Xiao, Y. Zheng, Z. Cao, Z. Sang, F. Su, i Y. Deng, *Bioorg. Med. Chem.* **25** (2017) 714–726.
188. G. Jo, S. Ahn, B.-G. Kim, H. R. Park, Y. H. Kim, H. A. Choo, D. Koh, Y. Chong, J.-H. Ahn, i Y. Lim, *Bioorg. Med. Chem.* **21** (2013) 7890–7897.
189. H. R. Park, J. Kim, T. Kim, S. Jo, M. Yeom, B. Moon, I. H. Choo, J. Lee, E. J. Lim, K. D. Park, S.-J. Min, G. Nam, G. Keum, C. J. Lee, i H. Choo, *Bioorg. Med. Chem.* **21** (2013) 5480–5487.
190. G. F. Mangiatordi, D. Alberga, L. Pisani, D. Gadaleta, D. Trisciuzzi, R. Farina, A. Carotti, G. Lattanzi, M. Catto, i O. Nicolotti, *Eur. J. Pharm. Sci.* **101** (2017) 90–99.
191. R. Borštnar, M. Repič, S. C. L. Kamerlin, R. Vianello, i J. Mavri, *J. Chem. Theory Comput.* **8** (2012) 3864–3870.
192. D. Bonivento, E. M. Milczek, G. R. McDonald, C. Binda, A. Holt, D. E. Edmondson, i A. Mattevi, *J. Biol. Chem.* **285** (2010) 36849–36856.
193. C. Binda, F. Hubálek, M. Li, Y. Herzig, J. Sterling, D. E. Edmondson, i A. Mattevi, *J. Med. Chem.* **47** (2004) 1767–1774.
194. H. O. Borbe, G. Niebch, i B. Nickel, in: *Amin. Oxidases Their Impact Neurobiol.:* (Springer Vienna, Vienna, 1990), pp. 131–137.
195. K. F. Tipton, *J. Neural Transm.* **125** (2018) 1519–1551.
196. A. C. Tripathi, S. Upadhyay, S. Paliwal, i S. K. Saraf, *Eur. J. Med. Chem.* **145** (2018) 445–

- 497.
197. C. D. Monte, M. D'Ascenzio, P. Guglielmi, V. Mancini, i S. Carradori, *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* **16** (2016) 98–104.
198. G. Di Giovanni, D. Svob Strac, M. Sole, M. Unzeta, K. F. Tipton, D. Mück-Šeler, I. Bolea, L. Della Corte, M. Nikolac Perkovic, N. Pivac, I. J. Smolders, A. Stasiak, W. A. Fogel, i P. De Deurwaerdère, *Front. Neurosci.* **10** (2016) 541.
199. P. Riederer, i T. Müller, *J. Neural Transm.* **125** (2018) 1751–1757.
200. K. F. Tipton, G. P. Davey, i A. G. McDonald, in: (2011), pp. 43–64.
201. P. Macheroux, S. Ghisla, C. Sanner, H. Rüterjans, i F. Müller, *BMC Biochem.* **6** (2005) 26.
202. G. Oanca, J. Stare, R. Vianello, i J. Mavri, *Eur. J. Pharmacol.* **817** (2017) 46–50.
203. R. R. Ramsay, *Curr. Pharm. Des.* **19** (2013) 2529–2539.
204. F. Hubálek, C. Binda, M. Li, Y. Herzig, J. Sterling, M. B. H. Youdim, A. Mattevi, i D. E. Edmondson, *J. Med. Chem.* **47** (2004) 1760–1766.
205. A. Albrecht, I. Vovk, J. Mavri, J. Marco-Contelles, i R. R. Ramsay, *Front. Chem.* **6** (2018).
206. G. Gadda, *Biochemistry* **51** (2012) 2662–2669.
207. M. Henderson Pozzi, i P. F. Fitzpatrick, *Arch. Biochem. Biophys.* **498** (2010) 83–88.
208. D. Pregeljc, U. Jug, J. Mavri, i J. Stare, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20** (2018) 4181–4188.

§ 8. ŽIVOTOPIS

Tana Tandarić

OSOBNI PODACI: Rođena 06. lipnja 1992. godine u Zagrebu, Hrvatska.

ZAPOSLENJA

- 12/2016–danas: asistent, Grupa za računalnu organsku kemiju i biokemiju, Zavod za organsku kemiju i biokemiju, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska (voditelj: dr.sc. Robert Vianello)
- Studijski boravak: Kemijski Institut, Ljubljana, Slovenija (1.10 - 31.10.2018.) - domaćin prof. dr. sc. Janez Mavri
- Studijski boravak: Sveučilište Sorbonne, Pariz, Francuska (15.11 - 15.12.2019.) - domaćin prof. dr. sc. Etienne Derat

OBRAZOVANJE

- 10/2016-danas: Doktorski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, smjer: organska kemija
- 10/2011–09/2016: mag.med.biochem, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- 02/2016-08/2016: Stručna praksa: medicinsko-biokemijski laboratorij, Klinika za tumore, KBC Sestre Milosrdnice, Zagreb
- 09/2007-06/2011: XV.gimnazija, Zagreb
- 09/1999-06/2007: OŠ Murterski škoji, Murter

NAGRADE I PRIZNANJA

- 12/2020: Godišnja nagrada Instituta Ruđer Bošković za znanstveni rad „*Computational Insight into the Mechanism of the Irreversible Inhibition of Monoamine Oxidase Enzymes by the Antiparkinsonian Propargylamine Inhibitors Rasagiline i Selegiline*“

- 12/2019: Godišnja nagrada Instituta Ruđer Bošković za znanstveni rad „*Chlorination of 5-fluorouracil: Reaction mechanism i ecotoxicity assessment of chlorinated products*“
- 09/2019: Thiene poster award, 16th European Symposium of Organic Reactivity, Dubrovnik
- 09/2015: Dekanova nagrada, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb
- 09/2014: Dekanova nagrada, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb

OBJAVLJENI ZNANSTVENI RADOVI

Broj radova u WoS časopisima: 13. Prosječni faktor odjeka: 3.76. Ukupni broj citata: 51. H-indeks: 4.

1. Marinović, M., Ivana Perković, I., Fontinha, D., Prudêncio, M., Held, J., Pessanha de Carvalho, L., **Tandarić, T.**, Vianello, R., Zorc, B., Rajić, Z. (2020) Novel Harmicines with Improved Potency against Plasmodium. *Molecules*, 25(19), 4376 doi: 10.3390/molecules25194376
2. **Tandarić, T.**, Prah, A., Stare, J., Mavri, J. & Vianello, R. (2020) Hydride Abstraction as the Rate-Limiting Step of the Irreversible Inhibition of Monoamine Oxidase B by Rasagiline i Selegiline: A Computational Empirical Valence Bond Study. *International journal of molecular sciences*, 21 (17), 6151, 13 doi:10.3390/ijms21176151.
3. Rimac, H., **Tandarić, T.**, Vianello, R. & Bojić, M. (2020) Indomethacin increases quercetin affinity for human serum albumin: a combined experimental i computational study i its broader implications. *International journal of molecular sciences*, 21 (16), 5740, 14 doi:10.3390/ijms21165740.
4. Perković, I., Raić-Malić, S., Fontinha, D., Prudêncio, M., Pessanha de Carvalho, L., Held, J., **Tandarić, T.**, Vianello, R., Zorc, B. & Rajić, Z. (2020) Harmicines – harmine i cinnamic acid hybrids as novel antiplasmodial hits. *European journal of medicinal chemistry*, 187, 111927, 16 doi:10.1016/j.ejmech.2019.111927.
5. **Tandarić, T.**, Hok, L. & Vianello, R. (2019) From Hydrogen Peroxide-Responsive Boronated Nucleosides Towards Antisense Therapeutics – A Computational Mechanistic Study. *Croatica chemica acta*, 92 (2), 287-295 doi:10.5562/cca3592.

6. Toma, M., Božičević, L., Lapić, J., Djaković, S., Šakić, D., **Tandarić, T.**, Vianello, R. & Vrček, V. (2019) Transacylation in Ferrocenoyl-Purines. NMR i Computational Study of the Isomerization Mechanism. *Journal of organic chemistry*, 84 (19), 12471-12480 doi:10.1021/acs.joc.9b01944.
7. **Tandarić, T.** & Vianello, R. (2019) Computational Insight into the Mechanism of the Irreversible Inhibition of Monoamine Oxidase Enzymes by the Antiparkinsonian Propargylamine Inhibitors Rasagiline i Selegiline. *ACS Chemical Neuroscience*, 10 (8), 3532-3542 doi:10.1021/acscemneuro.9b00147.
8. Matic, J., Šupljika, F., **Tandarić, T.**, Dukši, M., Piotrowski, P., Vianello, R., Brozovic, A., Piantanida, I., Schmuck, C. & Radić Stojković, M. (2019) DNA/RNA recognition controlled by the glycine linker i the guanidine moiety of phenanthridine peptides. *International journal of biological macromolecules*, 134, 422-434 doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.
9. Hok, L., Ulm, L., **Tandarić, T.**, Krivohlavek, A., Šakić, D. & Vrček, V. (2018) Chlorination of 5-fluorouracil: Reaction mechanism i ecotoxicity assessment of chlorinated products. *Chemosphere*, 207 (18), 612-619 doi:10.1016/j.chemosphere.2018.05.140.
10. **Tandarić, T.** & Vianello, R. (2018) Design of Exceptionally Strong Organic Superbases Based on Aromatic Pnictogen Oxides: Computational DFT Analysis of the Oxygen Basicity in the Gas Phase i Acetonitrile Solution. *The journal of physical chemistry. A, Molecules, spectroscopy, kinetics, environment, & general theory*, 122 (5), 1464-1471 doi:10.1021/acs.jpca.7b11945.
11. Dabić, D., Brkljačić, L., **Tandarić, T.**, Žinić, M., Vianello, R., Frkanec, L. & Kobetić, R. (2018) The Metal Effect on Self-Assembling of Oxalamide Gelators Explored by Mass Spectrometry i DFT Calculations. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 28 (1), 103-113 doi:10.1007/s13361-017-1834-5.
12. **Tandarić, T.**, Vrček, V. & Šakić, D. (2016) Quantum Chemical Study of HOCl-Induced Transformations of Carbamazepine. *Organic & biomolecular chemistry*, 14, 10866-10874 doi:10.1039/C6OB02166B.
13. Šakić, D., Šonjić, P., **Tandarić, T.** & Vrček, V. (2014) Chlorination of N-

Methylacetamide i Amide-Containing Pharmaceuticals : Quantum-Chemical Study of the Reaction Mechanism. The journal of physical chemistry. A, 118 (12), 2367-2376 doi:10.1021/jp5012846.

USMENA IZLAGANJA

Ukupan broj usmenih izlaganja: 6

- Tandarić T, Vianello R. Irreversible Inhibition of the MAOB Enzyme. A Computational Insight into the Inactivation Mechanism. Humboldt College, Zagreb, 2019.
- Tandarić T, Vianello R. Ireverzibilna inhibicija enzima monoaminooksidaze B: računalni uvid. Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a. Zagreb, 2019.
- Tandarić T, Vianello R. Računalni uvid u ireverzibilnu inhibiciju enzima monoaminooksidaze B. Drugi mini simpozij Sekcije za medicinsku i farmaceutsku kemiju. Zagreb, 2018.
- Tandarić T, Vianello R. Računalni uvid u ireverzibilnu inhibiciju enzima monoaminooksidaze B. XII. susret mladih kemijskih inženjera. (XII. SMLKI). Zagreb, 2018.
- Tandarić T, Vianello R. Computational insight into the cyclotrimerization of isocyanates using bicyclic guanidine catalyst. 24. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera (25HSKIKI). Poreč, 2017.
- Šonjić P, Tandarić T, Šakić D, Vrčec V. Utjecaj supstituenata na otpornost derivata barbiturne kiseline na kloriranje hipoklornom kiselinom. Kvantno-kemijska studija. 24. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera. (24HSKIKI) Zagreb, 2015.
- Šonjić P, Tandarić T, Šakić D, Vrčec V. Utjecaj supstituenata na N3 i C5 položaju na reaktivnost barbiturne s hipoklornom kiselinom. Kvantno kemijska studija. 1. Simpozij studenata kemičara. (SISK) Zagreb, 2014.
- Šonjić P, Tandarić T, Šakić D, Vrčec V. Zašto se barbiturati teško kloriraju? Kvantno kemijska studija 3. Simpozij studenata farmacije i medicinske biokemije (FARMEBS). Zagreb, 2014.

POSTERSKA PRIOPĆENJA

Ukupan broj posterskih priopćenja: 13

- Tandarić T, Vianello R. Computational insight into the MAO B enzyme irreversible

inhibition. 16th European Symposium of Organic Reactivity. Dubrovnik, 2019.

- Tandarić T, Vianello R. Irreversible inhibition of monoamine oxidase B enzyme. A computational insight. 5th EFMC Young Medicinal Chemist Symposium. Ljubljana, Slovenija, 2018.
- Tandarić T, Vianello R. Irreversible inhibition of monoamine oxidase B enzyme. A computational insight. XXV EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry. Ljubljana, Slovenija, 2018.
- Tandarić T, Vianello R. Irreversible inhibition of monoamine oxidase B enzyme. A computational insight. Computational chemistry day, Zagreb, 2018.
- Tandarić T, Vianello R. Računalni uvid u ireverzibilnu inhibiciju enzima monoaminooksidaze B. Drugi simpozij studenata doktorskih studija PMF-a. Zagreb, 2018.
- Tandarić T, Vianello R. Novel i Efficient Bicyclic Guanidine Catalyst For The Cyclotrimerization Of Isocyanates. A Quantum Chemical Study. 10th Joint Meeting on Medicinal Chemistry. Srebreno (Dubrovnik), 2017.
- Petrović Peroković V., Car Ž., Meglič K., Ribić R., Tandarić T., Vianello R., Tomić S. Novel Para Substituted N-Aryl 3-Hydroxypyridin- 4-One Mannosides: Synthesis, Hemagglutination Inhibitory Properties i Molecular Modeling. 10th Joint Meeting On Medicinal Chemistry. Srebreno (Dubrovnik), 2017.
- Hok L, Pem B, Tandarić T, Šakić D, Vrčec V. Kloriranje barbiturata, kvantno-kemijska studija mehanizma. 6. Simpozij studenata farmacije i medicinske biokemije (FARMEBS). Zagreb, 2017.
- Tandarić T, Hok L, Šakić D, Vrčec V. Mehanizam reakcije između 5-fluorouracila i hipokloraste kiseline. 6. Simpozij studenata farmacije i medicinske biokemije (FARMEBS). Zagreb, 2017.
- Hok L, Pem B, Tandarić T, Šakić D, Vrčec V. Chlorination of barbiturate. Quantum Chemical Study of Reaction Mechanism. 25th Croatian Meeting of Chemists i Chemical Engineers (25HSKIKI). Poreč, 2017.
- Tandarić T, Šonjić P, Šakić D, Vrčec V. Utjecaj supstituenata na reaktivnost derivata barbiturne kiseline s hipoklorastom kiselinom. 5th Croatian Congress of Pharmacy with

International Participation. Rovinj, 2015.

- Šakić D, Tandarić T, Vrček V. Why Hypochlorous Acid Chlorinates Amines Rather than Hydroxylates Them? 15th European Symposium of Organic Reactivity. Kiel, 2015.

ČLANSTVA

- 2016-danas: Hrvatsko kemijsko društvo (HKD)
- Speleološki odsjek Hrvatskog planinarskog društva Željezničar (speleolog pripravnik)
- Planinarsko društvo Zagreb

NASTAVA

- Sudjelovanje u nastavi Opće kemije sa stehiometrijom, seminari iz stehiometrije, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, ak.god. 2019/2020.

OSTALO

- 12/2018 -danas: Predsjednica Vijeća asistenata Instituta Ruđer Bošković
- Članica organizacijskog odbora 2. *Computational Chemistry Day* (Zagreb, 2019.)
- Sudjelovanje u organizaciji *MODENA Final Dissemination Conference* (Zagreb, 2016.)
- Članica organizacijskog odbora 2. Simpozija studenata kemičara (Zagreb, 2015.)
- Recenzent za: *Chemical Physics Letters*

Aktivno sudjelovanje u popularizaciji znanosti:

- Otvoreni dani Instituta Ruđer Bošković
- Otvoreni dani Kemijskog Odsjeka - računalna radionica
- *BASF Chemgeneration* radionice - priprema i izvođenje radionica
- Motivacijsko predavanje studentima Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta na Danima karijera 2018.
- Održano predavanje studentima iz Istanbula na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u sklopu projekta mobilnosti TWINNET Europskog udruženja studenata farmacije