Računalno ispitivanje katalitičke aktivnosti i selektivnosti aminskih oksidaza prema histaminu i N-metilhistaminu

Maršavelski, Aleksandra

Doctoral thesis / Disertacija

2017

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:268357

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

KEMIJSKI ODSJEK

Aleksandra Maršavelski

RAČUNALNO ISPITIVANJE KATALITIČKE AKTIVNOSTI I SELEKTIVNOSTI AMINSKIH OKSIDAZA PREMA HISTAMINU I *N*-METILHISTAMINU

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2017.

University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE

CHEMISTRY DEPARTMENT

Aleksandra Maršavelski

COMPUTATIONAL INVESTIGATION OF THE CATALYTIC ACTIVITY AND SELECTIVITY OF AMINE OXIDASES TOWARDS HISTAMINE AND *N*-METHYLHISTAMINE

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2017.

Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

KEMIJSKI ODSJEK

Aleksandra Maršavelski

RAČUNALNO ISPITIVANJE KATALITIČKE AKTIVNOSTI I SELEKTIVNOSTI AMINSKIH OKSIDAZA PREMA HISTAMINU I *N*-METILHISTAMINU

DOKTORSKI RAD

Mentor:

dr. sc. Robert Vianello

Zagreb, 2017.

University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE

CHEMISTRY DEPARTMENT

Aleksandra Maršavelski

COMPUTATIONAL INVESTIGATION OF THE CATALYTIC ACTIVITY AND SELECTIVITY OF AMINE OXIDASES TOWARDS HISTAMINE AND *N*-METHYLHISTAMINE

DOCTORAL THESIS

Supervisor:

dr. sc. Robert Vianello

Zagreb, 2017

Predgovor

Ova doktorska disertacija izrađena je u Grupi za računalnu organsku kemiju i biokemiju Zavoda za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu pod vodstvom dr. sc. Roberta Vianella, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog studija kemije pri Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Mentoru se zahvaljujem na pomoći pri odabiru teme i savjetima tijekom izrade ovog rada.

Istraživanje za potrebe ove disertacije dijelom je provedeno u grupi prof. dr. Lynn Kamerlin s Biomedicinskog centra u sklopu Sveučilišta u Uppsali u Švedskoj, zatim u grupi prof. dr. Janeza Mavrija s Nacionalnog kemijskog instituta u Ljubljani u Sloveniji gdje sam također surađivala i s dr. sc. Jernejem Stareom te im se zahvaljujem na prenesenom znanju iz oblasti EVB simulacija kao i na podršci tijekom izrade doktorske disertacije.

Posebno se zahvaljujem prof. dr. sc. Iti Gruić Sovulj na iznimnoj podršci, pomoći i suradnji kao i svim ostalim članovima Zavoda za biokemiju pri Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Zahvalnost dugujem profesorima Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu prof. dr. sc. Zlatku Mihaliću i prof. dr. sc. Tomici Hrenaru na komentarima i sugestijama tijekom završnog oblikovanja disertacije. Zahvaljujem se na podršci i prof. dr. sc. Ines Primožič, voditeljici poslijediplomskog studija kemije Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem se i znanstvenicima s Instituta Ruđer Bošković: prof. dr. sc. Sanji Tomić na prilici da uđem u svijet računalne biokemije i na prenesenom znanju iz oblasti molekulsko-dinamičkih simulacija; svim članovima Laboratorija za kemijsku i biološku kristalografiju na putu izrade ove disertacije, a posebno dr. sc. Aleksandru Višnjevcu, predsjedniku Hrvatske udruge kristalografa koji mi je u više navrata omogućio prezentaciju rezultata; dr. sc. Danijeli Barić na pomoći i savjetima u završnoj fazi izrade doktorske disertacije te svim ostalim znanstvenicima ovog Instituta s kojima sam surađivala.

Konačno, veliku zahvalnost dugujem emerit. dr. sc. Biserki Kojić-Prodić, zaslužnoj znanstvenici Instituta Ruđer Bošković, na njezinoj bezuvjetnoj podršci i pomoći te vjeri u mene koja me motivira i obvezuje.

Sadržaj

SAŽETAK viii

ABSTRACT ix

§ 1. UVOD 1

1.1. Svrha i cilj rada 2

§ 2. LITERATURNI PREGLED 4

2.1. Biosinteza histamina 4

2.2. Razgradnja histamina 6

2.3. Mehanizam aminskih oksidaza 8

2.3.1. Katalitički mehanizam enzima MAO B i DAO 8

2.4. Struktura aminskih oksidaza 11

2.4.1. Monoamin-oksidaza B 11

2.4.2. Diamin-oksidaza 13

2.5. Farmakološki značaj enzima MAO B i DAO 16

§ 3. TEORIJSKI DIO 17

3.1. Empirijske metode 17

3.1.1. Molekulska mehanika 18

3.1.1.1. Polje sila 19

3.1.1.2. Pretraživanje plohe potencijalne energije molekulskom mehanikom 22

3.1.1.3. Model otapala u molekulskoj mehanici 24

3.1.2. Statistička mehanika 24

3.1.3. Molekulska dinamika 28

3.1.3.1. Periodični rubni uvjeti 33

3.1.3.2. Priprema i pokretanje molekulsko-dinamičkih simulacija 34

3.1.4. Račun Gibbsove energije vezanja 34

3.2. Kvantna mehanika 37

3.2.1. Born-Oppenheimerova aproksimacija 38

3.2.2. Metoda Hartree-Fock 39

3.2.3. Metoda funkcionala gustoće (DFT) 40

3.2.4. Skup osnovnih funkcija 42

3.2.5. Izvođenje kvantno-mehaničkih računa 43

3.3. EVB metoda 48

3.4. Programi 51

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA 52

4.1. Histaminski receptor H_2 52

4.1.1. Modeliranje histaminskog receptora H_2 53

4.2. Monoamin-oksidaza B 59

4.2.1. Molekulsko-dinamičke simulacije enzima MAO B 60

4.2.2. Kvantno-mehanički računi na modelu enzima MAO B 67

4.2.3. Simulacije EVB reakcije oksidacije katalizirane enzimom MAO B 75

4.2.3.1. Priprema sustava za EVB simulacije 83

4.3. Diamin-oksidaza 85
4.3.1. Kvantno-mehanički računi na modelu enzima diamin-oksidaze 86
4.3.2. EVB simulacije reakcije oksidacije histamina katalizirane enzimom DAO 96
§ 5. ZAKLJUČAK 103
§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ 106
§ 7. LITERATURNI IZVORI 108
§ 8. DODATAK x
§ 9. ŽIVOTOPIS xii

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

RAČUNALNO ISPITIVANJE KATALITIČKE AKTIVNOSTI I SELEKTIVNOSTI AMINSKIH OKSIDAZA PREMA HISTAMINU I *N*-METILHISTAMINU

Aleksandra Maršavelski
Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, Zagreb, Hrvatska

U disertaciji je proučen katalitički mehanizam te supstratna specifičnost enzima MAO B i DAO koji su uključeni u katabolizam histamina. Naime, pokazano je kako je izmijenjena aktivnost i ekspresija enzima MAO B povezana s neurodegenerativnim bolestima poput Parkinsonove bolesti te neurološkim poremećajima, poput psihoze, depresije i impulzivnosti. S druge strane, izmijenjena aktivnost enzima DAO razlog je intolerancije na histamin, stanja koje je popraćeno neugodnim simptomima i probavnim problemima. Stoga, svrha ove disertacije je pouzdano definiranje katalitičkog mehanizma oba enzima te utvrđivanje determinanti specifičnosti primjenom najsuvremenijih metoda u računalnoj biokemiji. Rezultati disertacije mogli bi poslužiti kao temelj u racionalnom dizajnu lijekova za liječenje navedenih patoloških stanja. U radu su primijenjene računalne metode koje se koriste za proučavanje strukture, dinamike, selektivnosti i reaktivnosti enzima kao što su molekulsko-dinamičke simulacije, izračun Gibbsove energije vezanja, kvantno-mehanički računi u okviru klaster pristupa te metoda EVB. Molekulsko-dinamičke simulacije spomenutih enzima te izračun Gibbsove energije vezanja rezultirali su objašnjenjem supstratne specifičnosti enzima MAO B, dok su kvantno-mehanički računi u okviru klaster pristupa te metoda EVB dali kvantitativni uvid u katalitički mehanizam oba proučavana enzima.

(116 + XIV stranica, 45 slika, 12 tablica, 182 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: monoamin-oksidaza B, diamin-oksidaza, histamin, *N*-metilhistamin, molekulska dinamika, kvantno-mehanički računi, EVB simulacije

Mentor: dr. sc. Robert Vianello, znanstveni savjetnik, Institut Ruđer Bošković
Ocjenitelji: prof. dr. sc. Tomica Hrenar, Prirodoslovno-matematički fakultet
prof. dr. sc. Janez Mavri, Kemijski institut, Ljubljana, Slovenija
prof. dr. sc. Zlatko Mihalić, Prirodoslovno-matematički fakultet

Rad prihvaćen: 28. lipnja 2017.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

COMPUTATIONAL INVESTIGATION OF THE CATALYTIC ACTIVITY AND SELECTIVITY OF AMINE OXIDASES TOWARDS HISTAMINE AND *N*-METHYLHISTAMINE

Aleksandra Maršavelski
Ruđer Bošković Institute, Bijenička cesta 54, Zagreb, Croatia

The scope of this dissertation is the elucidation of the catalytic mechanism and substrate specificity of MAO B and DAO enzymes involved in the catabolism of histamine. Altered expression and activity of MAO B is associated with neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease, and neurological disorders such as psychosis, depression and impulsivity. On the other hand, the altered enzyme activity of DAO is the root cause for the histamine intolerance, a condition which is characterized by unpleasant symptoms and gastrointestinal problems. Therefore, the purpose of this dissertation is to establish the catalytic mechanism of both enzymes together with the determinants of their specificity using the most advanced methods in computational biochemistry such as molecular dynamics simulations, binding free energy and quantum mechanical calculations within the cluster approach and the empirical valence bond (EVB) simulations. Molecular dynamics simulations and the binding free energy calculations explain the substrate specificity of MAO B enzyme, while the quantum mechanical calculations together with the EVB simulations provide a quantitative insight into the catalytic mechanism of both enzymes.

(116 + XIV pages, 45 figures, 12 tables, 182 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: monoamine oxidase B, diamine oxidase, histamine, *N*-methylhistamine, molecular dynamics, quantum mechanical calculations, EVB simulations

Supervisor: Dr. Robert Vianello, Senior Scientist, Ruđer Bošković Institute
Reviewers: Prof. Dr. Tomica Hrenar, Faculty of Science
Prof. Dr. Janez Mavri, National Institute of Chemistry, Ljubljana, Slovenia
Prof. Dr. Zlatko Mihalić, Faculty of Science

Thesis accepted: June 28th, 2017

§ 1. UVOD

Histamin se sintetizira u reakciji dekarboksilacije aminokiseline histidina koja je katalizirana enzimom L-histidin-dekarboksilazom. Histamin je iznimno važan spoj koji djeluje kao neurotransmiter, a također je uključen i u mnoge fiziološki bitne procese poput lokalnog imunološkog odgovora te reguliranja lučenja želučane kiseline. Najveći dio histamina u tijelu stvara se u bazofilima i u mastocitima vezivnog tkiva, a također se sintetizira i u histaminergičnim neuronima u mozgu.

Kod ljudi histamin primarno djeluje kroz ostvarivanje interakcija s nekim od četiri histaminska receptora povezana s G proteinima. Vezanje histamina za receptor H_1 rezultira kontrakcijom glatkih mišića, vezanje za receptore H_2 stimulira lučenje želučane kiseline, vezanje za receptore H_3 regulira otpuštanje neurotransmitera, dok vezanje za receptore H_4 rezultira produkcijom citokina.[1] Nakon što djeluje u skladu sa svojom biološkom ulogom histamin se degradira u jednom od dva katabolička puta u kojima sudjeluju enzimi iz skupine aminskih oksidaza, monoamin-oksidaza B i diamin-oksidaza. U mozgu, histamin se primarno degradira u metaboličkom putu koji počinje s reakcijom metiliranja histamina koja je katalizirana histamin-*N*-metiltransferazom, pri čemu nastaje *N*-metilhistamin koji se zatim degradira monoamin-oksidazom B (MAO B), dok je u drugim tkivima zastupljena direktna oksidacija histamina enzimom diamin-oksidazom (DAO).[2]

Aminske oksidaze (AO) kataliziraju reakciju oksidacije velikog broja biogenih amina do aldehida uz stvaranje amonijaka i vodikovog peroksida. Dijele se u dvije skupine, aminske oksidaze koje sadrže flavin i aminske oksidaze koje sadrže bakar. Primjeri aminskih oksidaza koje sadrže flavin su monoamin-oksidaza A i B koje kod kralježnjaka imaju ulogu u regulaciji koncentracije amina. Enzimi MAO A i B se u stanici nalaze vezani za vanjsku mitohondrijsku membranu i međusobno dijele 70 % identičnosti u primarnoj strukturi. Obje forme imaju očuvan pentapeptidni slijed Ser-Gly-Gly-Cys-Tyr za čiji cistein se kovalentno veže kofaktor flavin-adenin-dinukleotid, FAD.[3] Razlike između ove dvije izoforme odnose se na njihovu strukturu te supstratnu specifičnost. Naime, MAO A je monomer koji na prvom mjestu oksidira serotonin i norepinefrin, dok je MAO B homodimerni enzim koji oksidira feniletilamin i *N*-metilhistamin.[4,5] Obje forme mogu oksidirati dopamin.[6] Aktivna mjesta enzima MAO A i B su hidrofobna koja se sastoje uglavnom iz aromatskih i alifatskih aminokiselina. Mjesto u kom se veže supstrat u enzimu MAO A sastoji se od šupljine približne veličine od 400 $Å^3$ (ref. 7) dok

se u enzimu MAO B nalazi još jedna manja hidrofobna šupljina između površine enzima i glavnog veznog mjesta za supstrate. Pokazano je kako rotiranje Ile199 omogućava spajanje dvije šupljine u jednu veću[8] veličine od oko 700 $Å^3$ te da u ovisnosti o vrsti vezanog supstrata šupljine ostaju razdvojene ili se spajaju u jednu cjelinu.[9] Kod MAO A umjesto Ile199 nalazi se Phe208. Druga razlika u veznom mjestu između ova dva enzima se odnosi na Ile335 kod MAO A koji je zamijenjen Tyr326 u enzimu MAO B. Pretpostavlja se kako upravo ove dvije aminokiseline determiniraju supstratnu specifičnost enzima MAO A i B.

S druge strane, aminske oksidaze koje sadrže bakar su homodimerni enzimi čije su podjedinice kovalentno povezane disulfidnim mostovima. Kataliziraju oksidaciju primarnih amina do odgovarajućih aldehida u reakciji koja zahtjeva ion bakra po podjedinici enzima i kofaktor topakinon (TPQ) koji nastaje posttranslacijskom modifikacijom očuvanog tirozina.[10] Enzimi iz ove skupine imaju različite fiziološke uloge kod eukariota i prokariota. Kod mikroorganizama imaju ulogu u osiguravanju ugljika i dušika iz amina.[11] Kod eukariota imaju širi spektar uloga, poput sudjelovanja u staničnom rastu,[12] zarastanju rana i detoksifikaciji.[13]

1.1. Svrha i cilj rada

Aminske oksidaze su grupa enzima koji sudjeluju u oksidaciji velikog broja biogenih amina poput neurotransmitera te ksenobiotičkih amina. Unatoč brojnim eksperimentalnim i računalnim istraživanjima provedenim u svrhu ispitivanja katalitičkog mehanizma aminskih oksidaza, još uvijek ne postoji konsenzus oko točnog mehanizma djelovanja ovih važnih enzima. Ova doktorska disertacija je usmjerena na proučavanje metabolizma jednog od navažnijih biogenih amina u tijelu – histamina. Nakon što se sintetizira iz esencijalne aminokiseline histidina, histamin ostvaruje svoju biološku ulogu vezanjem za jedan od četiri histaminska receptora. Aktivirani receptori prenose signal koji rezultira specifičnom biološkom aktivnošću. Višak histamina se mora ukloniti unutar jednog od dva metaboličkog puta u kojima sudjeluju aminske oksidaze. U sklopu jednog puta monoamin-oksidaza B (MAO B) oksidira prethodno metilirani histamin, *N*-metilhistamin, dok unutar drugog puta, enzim diamin-oksidaza (DAO) direktno oksidira histamin.

S obzirom na sve navedeno, specifični ciljevi ove disertacije su sljedeći:

1. Definirati interakcije u veznom mjestu histaminskog receptora H_2 koje su nužne za pravilno vezanje i smještanje histamina.
2. Utvrditi determinante specifičnosti enzima MAO B prema *N*-metilhistaminu u odnosu na histamin.
3. Utvrditi mehanizam reakcije oksidacije histamina i *N*-metilhistamina katalizirane enzimom MAO B.
4. Utvrditi mehanizam reakcije oksidacije histamina katalizirane enzimom DAO.

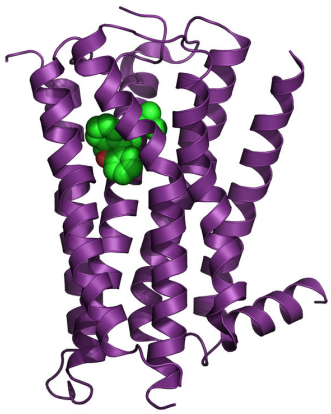
U ostvarivanju cilja 1. korišteno je homologno modeliranje histaminskog receptora H_2 s obzirom na to da njegova trodimenzionalna struktura nije poznata, a zatim su metodom molekulske dinamike identificirane važne interakcije u veznom mjestu receptora. U ostvarivanju ciljeva 2.-4. korištene su metode molekulske dinamike, metoda MM-PBSA za računanja slobodne energije vezanja, kvantno-mehanički računi u okviru klaster pristupa te metoda EVB.

Očekivani znanstveni doprinos ove disertacije odnosi se na bolje razumijevanje metabolizma histamina. Nakon što histamin izvrši svoju biološku ulogu vezanjem za jedan od četiri receptora, mora se razgraditi u metaboličkim putevima u kojima sudjeluju aminske oksidaze, MAO B i DAO. Stoga, zanstveni doprinos podrazumijeva određivanje čimbenika koji utječu na supstratnu selektivnost MAO B, zatim definiranje katalitičkog mehanizma reakcije oksidativne deaminacije histamina katalizirane enzimima MAO B i DAO. Dobiveni razultati mogli bi poslužiti za definiranje smjernice u razvoju efikasnijih lijekova, bilo da je riječ o potentnijim histaminskim antagonistima ili o lijekovima koji se koriste za liječenje neurodegenerativnih bolesti, a čija važna farmakološka meta je MAO B. Također, dobiveni rezultati mogu pomoći u razvoju uspješnije terapije koja bi se koristila u tretmanu intolerancije na histamin.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

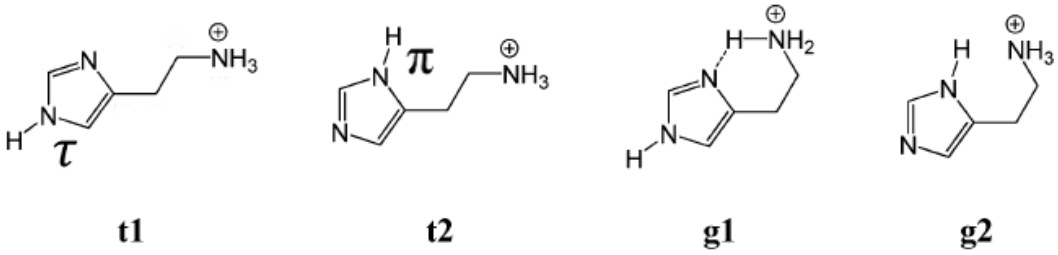
2.1. Biosinteza histamina

Histamin su otkrili Dale i Laidlaw još 1910. godine,[14] a identificiran je kao medijator anafilaktičke reakcije 1932. godine.[15] Jedna je od najvažnijih signalnih molekula koja je uključena u brojne fiziološke procese poput upalnog odgovora, sekrecije želučane kiseline, neuromodulacije te regulacije imuniteta. S obzirom na to da je medijator mnogih biološki važnih procesa, koncentracija histamina u organizmu, odnosno njegova biosinteza i razgradnja moraju biti pažljivo regulirani. Histamin se sintetizira iz esencijalne aminokiseline histidina djelovanjem enzima L-histidin-dekarboksilaze (LHD). LHD je homodimerna, piridoksal-fosfat-ovisna dekarboksilaza visoke specifičnosti prema histidinu s kojeg uklanja karboksilnu skupinu pri čemu nastaje histamin. Histamin se sintetizira u mastocitima, bazofilima i histaminergičnim neuronima gdje se pohranjuje u vezikulama te biva otpušten nakon određenog stimulusa. Histamin svoje biološko djelovanje iskazuje vezanjem za jedan od četiri membranska histaminska receptora, H_1, H_2, H_3 i H_4. Zna se da vezanje histamina za receptore H_1 dovodi do kontrakcije glatkih mišića i endotelnih stanica zatim do povećanja vaskularne permeabilnosti te do akutne alergijske reakcije. Aktivacija receptora H_2 pak rezultira sekrecijom želučane kiseline, dok vezanje histamina za receptore H_3, koji se nalaze isključivo u tkivu živčanog sustava, regulira otpuštanje neurotransmitera. Konačno, aktiviranje receptora H_4 histaminom rezultira regulacijom produkcije citokina što ima različite imunomodulatorne učinke. Histaminski receptori spadaju u kategoriju receptora povezanih s G proteinima, a do danas je riješena samo struktura receptora H_1[16] koja se sastoji iz 7 transmembranskih α-zavojnica (Slika 1).



Slika 1. Struktura histaminskog receptora H_1 dobivena difrakcijom rendgenskih zraka (PDB kod 3RZE). Zelenom bojom prikazan je doksepin, antagonist receptora H_1.

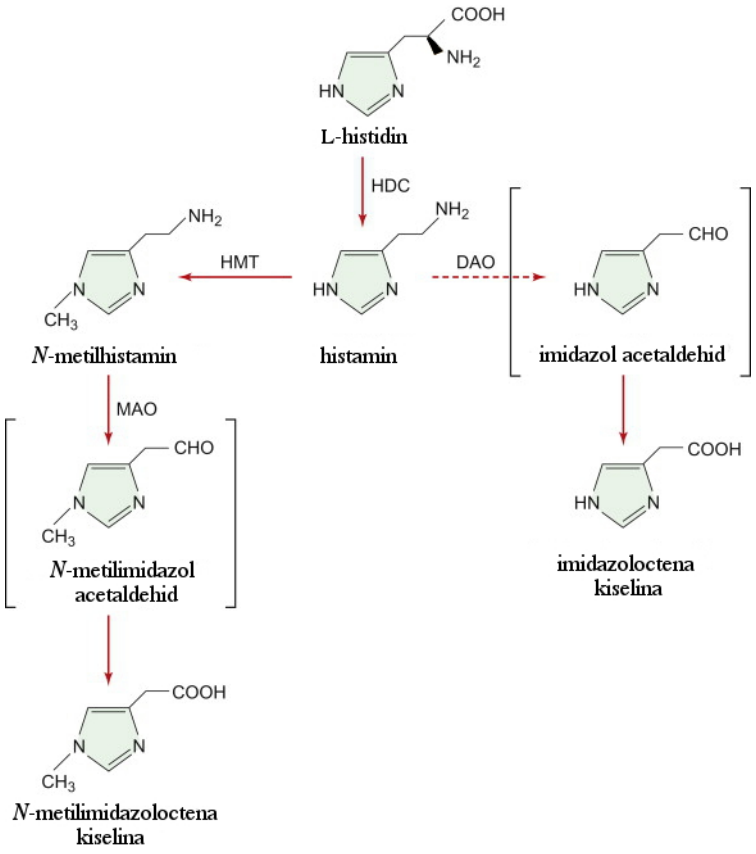
Histamin se sastoji iz etilamino lanca vezanog za imidazolni prsten. Oba dijela molekule imaju funkcionalne skupine s kiselinsko-baznim svojstvima: alifatsku amino skupinu ($pK_a \approx 9{,}4$) te dušik na imidazolnom prstenu ($pK_a \approx 5{,}8$). Pri fiziološkom pH ≈ 7,4 histamin postoji dominantno (96 %) kao monokation protoniran na alifatskoj amino skupini. U odnosu na imidazolni prsten, etilamino lanac može zauzeti više različitih konformacija koje su klasificirane u dvije glavne kategorije, *linearni* (t1 i t2) i *cikličk*i oblici (g1 i g2) monokationskog histamina (Slika 2). S druge strane, imidazolni prsten može postojati u dva tautomerna oblika, N^{π}-H-histamin i N^{τ}-H-histamin u ovisnosti od pozicije vodikovog atoma na jednom od dva dušikova atoma imidazolnog prstena. Na taj način, dobivamo ukupno 4 moguća histaminska monokationa (Slika 2). Eksperimentalna i računalna istraživanja potvrdile su da je u vodenoj otopini najzastupljeniji, t1, linerani oblik N^{τ}-H[17] (Slika 2).



Slika 2. Mogući tautomeri i konformeri monokationskog histamina (prerađeno i preuzeto iz [17]).

2.2. Razgradnja histamina

Dva puta razgradnje histamina kod ljudi i sisavaca prikazani su na Shemi 1.



Shema 1. Dva puta razgradnje histamina kod sisavaca.

Diamin-oksidaza (DAO) je sekrecijski enzim dominantno eksprimiran u endotelu crijeva te je primarno odgovoran za razgradnju ekstracelularnog histamina. DAO direktno metabolizira histamin do imidazol acetaldehida koji se oksidira do imidazoloctene kiseline u reakciji koju katalizira aldehid-dehidrogenaza. U drugom kataboličkom putu, histamin se prvo metilira u reakciji koju katalizira histamin-*N*-metiltransferaza (HMT). HMT katalizira metiliranje histamina u prisutnosti *S*-adenozil-L-metionina (SAM) koji služi kao donor metilne skupine pri čemu nastaje *N*-metilhistamin koji se dalje razgrađuje enzimom monoamin-oksidaza B (MAO B) do *N*-metilhistamin-imina. Dobiveni imin napušta aktivno mjesto enzima te se neenzimski hidrolizira do odgovarajućeg aldehida. Za razliku od MAO B, enzim DAO ima podjednak afinitet prema histaminu i *N*-metilhistaminu, te su oba spoja supstrati reakcije koju katalizira ovaj enzim.[18,19] Ovo je posebno značajno s obzirom na to da histamin-*N*-metiltransferaza

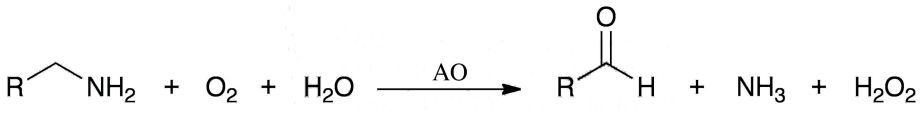
(HMT) pokazuje snažnu inhibiciju svojim produktom (*N*-metilhistaminom), što čini DAO primarnim enzimom za inaktivaciju histamina, budući da djeluje direktno na histamin, ali i na produkt iz drugog metaboličkog puta za razgradnju histamina, a koji je ujedno i inhibitor enzima HMT. S druge strane, supstratna preferencija enzima MAO B prema *N*-metilhistaminu je zanimljiva s obzirom na to da se histamin i *N*-metilhistamin razlikuju u samo jednoj metilnoj skupini u nereaktivnom dijelu molekule.

Kao što se može vidjeti iz Tablice 1, MAO B efikasno razlikuje *N*-metilhistamin i histamin. Konstante specifičnosti (k_{cat}/K_m) enzima MAO B za oba supstrata govore u prilog tome da je *N*-metilhistamin puno bolji supstrat od histamina. S druge stane, enzim DAO jednako dobro razgrađuje oba supstrata.

Tablica 1. Kinetički parametri za *N*-metilhistamin i histamin u reakciji oksidativne deaminacije koju kataliziraju enzimi MAO B i DAO.[20,21]

	k_{cat} / min^{-1}	$\Delta^{\ddagger}G^{o}$ / kcal mol^{-1}	K_m / μM	$\Delta G^{o}_{vezanja}$ / kcal mol^{-1}	k_{cat}/K_m / $s^{-1}mM^{-1}$
	***N*-metilhistamin**				
MAO B	35	17,89	166	-5,16	3,51
DAO	103	17,24	3,4	-7,46	504,90
	Histamin				
MAO B	3,5	19,26	~ 4000	-3,27	0,014
DAO	139	17,06	2,8	-7,57	827,38

DAO i MAO B spadaju u grupu enzima koji se nazivaju aminske oksidaze (AO), a koje kataliziraju razgradnju aminskih spojeva do odgovarajućih aldehida uz stvaranje vodikovog peroksida i amonijaka (Shema 2).



Shema 2. Prikaz rekacije oksidativne deaminacije biogenih amina katalizirane aminskim oksidazama.

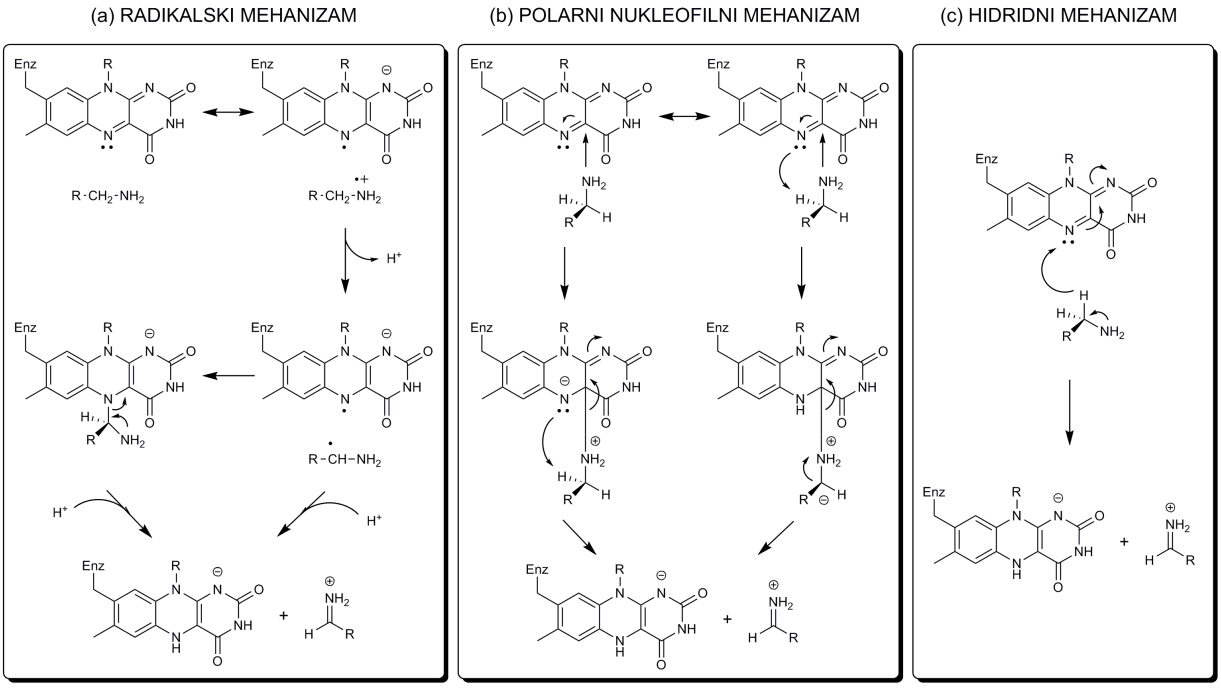
Aminske oksidaze dijele se u dvije strukturno različite skupine: A) aminske oksidaze koje sadrže bakar (primjer enzima je diamin-oksidaza, DAO) i B) aminske oksidaze koje sadrže flavin-adenin-dinukleotid (FAD) kofaktor (primjer enzima je monoamin-okisdaza B, MAO B).

2.3. Mehanizam aminskih oksidaza

Mehanizam aminskih oksidaza može se predstaviti u dva koraka. U prvom nastaje reducirani kofaktor enzima i imin, a u drugom dolazi do reoksidacije kofaktora enzima uz istodobnu produkciju amonijaka i vodikovog peroksida. Unatoč vrlo kompetitivnim istraživanjima koja traju desetljećima u literaturi još uvijek ne postoji konsenzus oko točnog katalitičkog mehanizma ovih enzima.

2.3.1. Katalitički mehanizam enzima MAO B i DAO

Mehanizam prvog koraka reakcije koju katalizira enzim MAO B dugi je niz godina predmet opsežnih eksperimentalnih i računalnih istraživanja. Zna se da oksidacija aminskih supstrata obuhvaća uklanjanje dva protona i dva elektrona kako bi iz jednostruke C-N veze nastala dvostruka C=N veza, a strukturna,[22] kinetička i spektroskopska istraživanja[23,24] ponudila su tri prijedloga mogućeg katalitičkog mehanizma enzima MAO B (Slika 3): (a) mehanizam koji ide preko radikala, (b) polarno-nukleofilni mehanizam i (c) hidridni mehanizam.



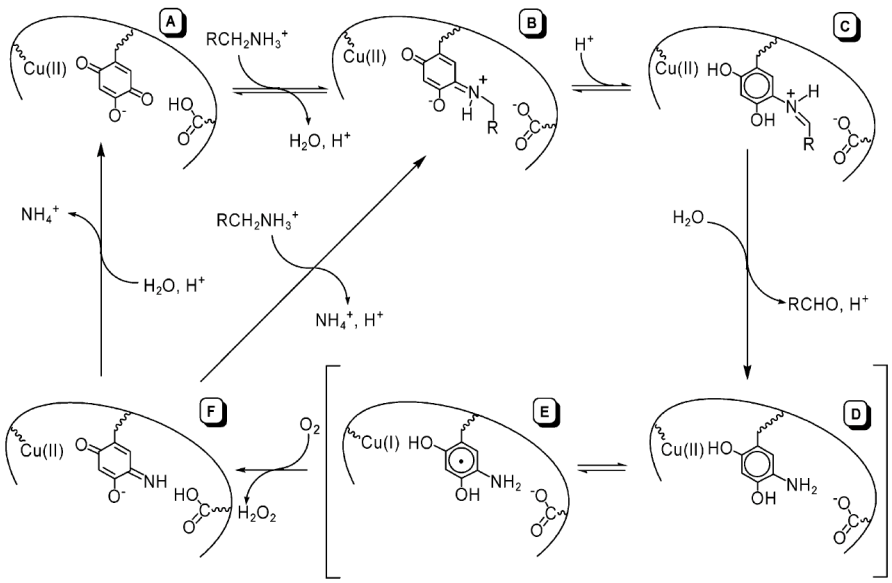
Slika 3. Tri moguća mehanizma predložena u literaturi za reakciju razgradnje amina do imina koja je katalizirana enzimom MAO B.

Istraživanja na deuteriranim supstratima nedvojbeno su pokazala da je ključni korak reakcije koju katalizira enzim MAO B cijepanje C–H veze u susjedstvu amino skupine na supstratu[25] te se predloženi mehanizmi razlikuju u prirodi vodika koji se prenosi na atom N5 kofaktora enzima: atom vodika ($H^{\bullet}$) u radikalskom mehanizmu, proton (H^{+}) u polarnom nukleofilnom mehanizmu te hidridni anion (H^{-}) u hidridnom mehanizmu.

Radikalski mehanizam predložen je na temelju inhibicije MAO B analogom ciklopropilamina s obzirom na to da je od ranije poznato da se ciklopropilni prsten otvara kroz radikalski mehanizam.[26] Izostanak čvrstih dokaza o postojanju flavin-semikinona detektiranog spektroskopijom EPR bio je glavni argument protiv radikalskog mehanizma. Eksperimentalna istraživanja u kojima su benzilamini supstituirani na *para* poziciji elektron odvlačećim skupinama rezultirale su povećanjem brzine reakcije oksidativne deaminacije,[27,28] što je osiguralo eksperimentalnu potporu da je prijenos protona uključen u katalizu na temelju čega je predložen polarni nukleofilni mehanizam kao najizgledniji.[29] Istraživanja na modelnom spoju, metillumiflavinu pokazala su kako oksidacija amina ide kroz stvaranje nestabilnog kovalentnog adukta supstrata i flavinskog kofaktora koji se zatim u sljedećem koraku raspada na imin u procesu koji je uključuje prijenos protona sa supstrata.[30] Prijenos protona zahtjeva prisutnost baze u aktivnom mjestu enzima, međutim strukturna analiza nije pokazala da u aktivnom mjestu postoji aminokiselina koja bi mogla djelovati kao baza, tj. primila proton sa supstrata. Također, postojanje kovalentnog adukta supstrata i flavina u aktivnom mjestu enzima nije nikada eksperimentalno dokazano što sve skupa isključuje polarni nukleofilni mehanizam. Mogućnost hidridnog mehanizma zatim je predložena na temelju sličnosti enzima MAO B s flavoenzimom oksidazom D-aminokiselina (engl. *D-amino acid oxidase*, DAAO). Naime, kinetička mjerenja na enzimu DAAO[31] te istraživanja na drugim sličnim enzimima poput triptofan-2-monooksigenaze[32] i *N*-metiltriptofan-oksidaze[33] predložila su prijenos H^{-} kao najizgledniji mehanizam. Računalna istraživanja provedena kvantno-mehaničkim DFT računima u okviru klaster pristupa na modelu enzima pokazala su puno veću vjerojatnost hidridnog mehanizma u odnosu na preostala dva predložena mehanizma.[34,35] Zatim su simulacije cijelog MAO B u kompleksu s dopaminom primjenom metode EVB (engl. *empirical valence bond*, EVB), rezultirale standardnom Gibbsovom energijom aktivacije od $\Delta^{\ddagger}G^{o}$=16,1 kcal mol^{-1} (ref. 35) što je u potpunom slaganju s dostupnom eksperimentalnom vrijednosti od 16,5 kcal mol^{-1} (ref. 20) pružajući snažnu potporu hidridnom mehanizmu. Hidridni mehanizam kasnije je potvrđen i u drugim istraživanjima provedenim na enzimu MAO[36-38] te na sličnim flavoenzimima.[39,40] Svakako najsnažniji eksperimentalni dokaz koji ide u prilog hidridnom mehanizmu pružila je nedavna analiza bazirana na ^{13}C kinetičkom izotopnom efektu u kojoj je

uvjerljivo pokazano kako katalitički mehanizam MAO B i nekih strukturno sličnih flavoenzima uključuje prijenos hidridnog iona sa supstrata na kofaktor.[41]

Za razliku od reakcije koju katalizira enzim MAO B, oksidativna deaminacija histamina koju katalizira enzim DAO nije dovoljno opisana u literaturi, a svi dostupni podaci ukazuju na jedan mehanizam. Na temelju strukture enzima DAO u kompleksu s inhibitorom 2-hidrazinopiridinom[42] kao i iz nekolicine kinetičkih studija[43-45] ponuđen je katalitički mehanizam ovog enzima. Predloženi mehanizam podrazumijeva formiranje Schiffove baze između amina supstrata te atoma C5 iz karbonilne skupine kofaktora TPQ enzima, a takva Schiffova baza je detektirana u eksperimentima s modelnim spojevima i kovalentnim inhibitorima.[46,47] Ključni korak u spomenutom mehanizmu je pretvorba inicijalne "supstrat Schiffove baze" u "produkt Schiffovu bazu", (Slika 4 B → C). Ova pretvorba podrazumijeva prijenos vodika s α-ugljikove pozicije supstrata na karbonil kofaktora TPQ.[48] Pretpostavlja se da prijenos vodika potpomaže anionska forma kofaktora te očuvani aspartat u aktivnom mjestu enzima (Slika 4), s procijenjenom p*K*a vrijednosti od oko 5, a eksperimenti u kojima je ovaj aspartat mutiran uputili su na važnost ove aminokiseline u katalizi.[42,49-50] Zatim se produkt reakcije, aldehid, oslobađa u reakciji hidrolize, što rezultira ravnotežom između Cu(II)-aminoresorcinola i Cu(I)-semikinona (Slika 4 D → E). U prisutnosti kisika dolazi do oksidacije iminokinona pri čemu nastaje H_2O_2. Na samom kraju katalitičkog ciklusa dolazi do hidrolize te oslobađanja amonijevog iona pri čemu se kofaktor regenerira (Slika 4 F → A). Također, NH_4^+ može biti oslobođen i u reakciji transiminacije između iminokinona i supstrata, pri čemu se formira "supstrat Schiffova baza" (Slika 4 F → B).[51] Pretpostavlja se da kod raznih bakar-ovisnih aminskih oksidaza postoje različiti mehanizmi za regeneraciju kofaktora.

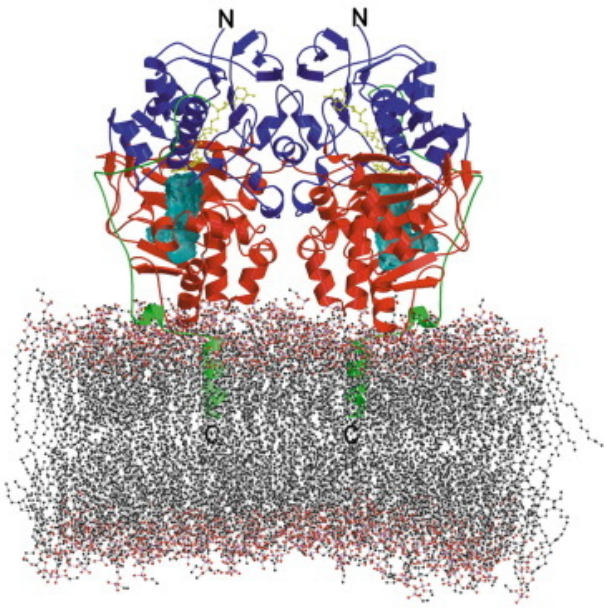


Slika 4. Predloženi katalitički mehanizam diamin-oksidaze. (prerađeno i preuzeto iz [52]).

2.4. Struktura aminskih oksidaza

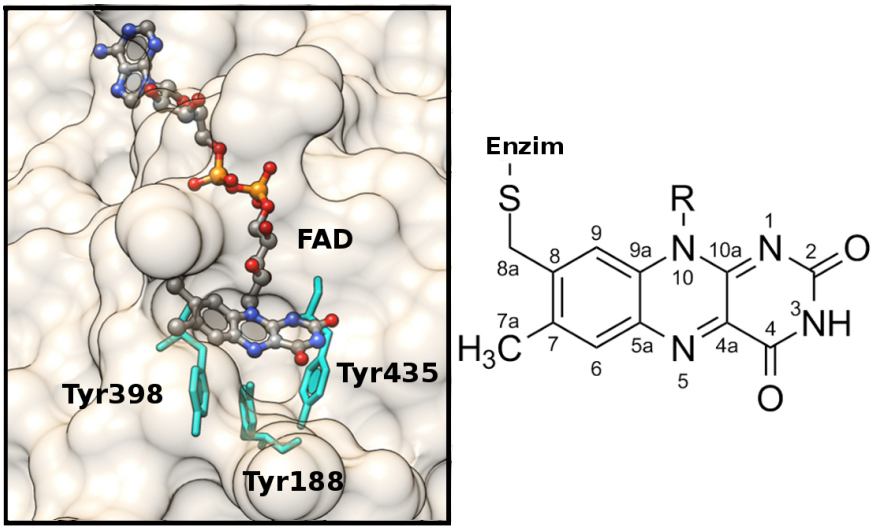
2.4.1. Monoamin-oksidaza B

MAO B je homodimerni enzim koji je usidren u vanjskoj membrani mitohondrija preko transmembranskih zavojnica koje se nalaze na C-kraju.[53] U dimernoj strukturi enzima ove transmembranske zavojnice su dovoljno udaljene jedna od druge tako da ne uspostavljaju međusobne kontakte. Svaka podjedinica ima 520 aminokiselina, od kojih je otapalu izložen gotovo cijeli enzim (1-488 aminokiselina u sekvenci) dok je preostali dio smješten u membrani (Slika 5). Svaka podjedinica enzima ima po jedno aktivno mjesto, a kinetičke studije su pokazale da su aktivna mjesta neovisna jedna od drugog. Skraćivanje C-kraja na različitim položajima utječe na katalitičku aktivnost enzima MAO B što ukazuje da je ovaj strukturni element bitan za funkcionalnost i za stabilnost enzima.[54] Veza između vezanja enzima za mitohondrijsku vanjsku membranu i njegove fiziološke uloge još nije razjašnjena, a zanimljivo je da druge aminske oksidaze nisu membranski proteini.[55] MAO B je promiskuitetni enzim koji je aktivan na većem broju supstrata kao što su dopamin, adrenalin i *N*-metilhistamin. Također je aktivan i na arilalkilaminima poput benzilamina i feniletilamina. Svrha razgradnje takvih egzogenih amina je u sprječavanju njihove moguće aktivnosti kao lažnih neurotransmitera.



Slika 5. Prikaz strukture enzima MAO B usidrenog u vanjskoj membrani mitohondrija (prerađeno i preuzeto iz [53]).

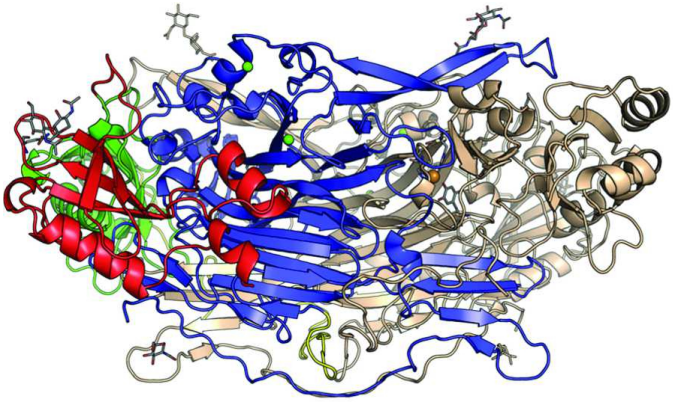
MAO B ima flavin-adenin-dinukleotid (FAD) kofaktor koji je, za razliku od velike većine flavoenzima, kovalentno vezan za Cys397 8α-tioeterskom vezom, a koji je dio očuvanog slijeda Ser-Gly-Gly-Cys-Tyr (Slika 6). Studije mutageneze u kojima je Cys397 zamijenjen serinom ili histidinom pokazale su kako je ova aminokiselina esencijalna za enzimsku aktivnost.[56,57] Detaljna strukturna analiza uputila je na značaj aromatskih aminokiselina u aktivnom mjestu enzima, konkretno Tyr188, Tyr398 te Tyr435 koji tvore strukturu tipa kaveza (engl. *aromatic cage*). Studije mutageneze u kojima je Tyr435 zamijenjen u Phe, His, Leu, i Trp, pokazale su smanjenu aktivnost mutiranih enzima u usporedbi s enzimom divljeg tipa.[24] Pretpostavlja se da "aromatski kavez" omogućava usmjeravanje supstrata k reaktivnom dušiku N5 na kofaktoru FAD te osigurava pogodnu konformaciju i orijentaciju supstrata za reakciju. Pokazano je da se amini vežu u protoniranom obliku u aktivnom mjestu enzima, ali da u reakciju ulaze u deprotoniranoj formi.[27]



Slika 6. Prikaz kofaktora FAD enzima MAO B i "aromatskog kaveza" u tirkiznoj boji (lijevo). Atomi na kofaktoru označeni su na slici desno. (preuređeno i preuzeto iz [58]).

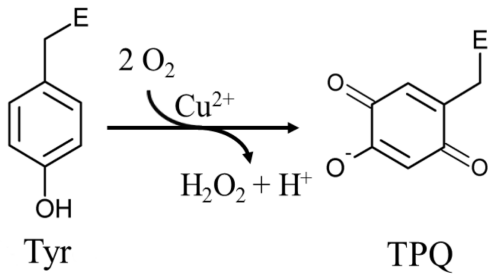
2.4.2. Diamin-oksidaza

DAO je prvotno identificiran kao enzim koji uklanja egzogeni histamin iz homogeniziranih uzoraka pluća i jetre te je stoga nazvan histaminazom.[59] Kod ljudi, DAO je primarni enzim u katabolizmu endogenog i egzogenog histamina. DAO metabolizira direktno histamin, ali i *N*-metilhistamin[60] koji nastaje u drugom kataboličkom putu histamina djelovanjem enzima histamin-*N*-metiltransferaze (HMT). Smanjena aktivnost enzima DAO direktno je povezana sa stanjem koje se naziva intolerancija na histamin, a koje podrazumijeva probavne tegobe praćene simptomima kao što su hipotenzija i glavobolja.[61] Diamin-oksidaza je aminska oksidaza koja sadrži bakar te kofaktor 2,4,5-trihidroksifenilalanin-kinon (TPQ). Unutar svake podjedinice enzima uočena su i dva iona kalcija. Enzim DAO je uglavnom eksprimiran u stanicama crijeva,[62,63] bubrega[64,65] te u maloj mjeri u placenti.[21] DAO je homodimerni enzim s dva neovisna aktivna mjesta (Slika 7). Ima 751 aminokiselinu po svakoj podjedinici, od čega prvih 19 aminokiselina predstavljaju signalni peptid.[66]



Slika 7. Struktura enzima DAO (preuređeno i preuzeto iz [67]).

Kofaktor TPQ se formira posttranslacijski iz očuvanog tirozina koji je dio sekvence Ser/Thr-Xaa-Xaa-Asn-Tyr(TPQ)-Asp/Glu-Tyr/Asn, u spontanoj oksidaciji koja zahtijeva prisutnost kationa Cu^{2+} i kisika (Slika 8).[68,69] U enzimu DAO, bakar je koordiniran s tri histamina (His510, His512 i His675) te s atomom O4 iz deprotonirane hidroksilne skupine kofaktora TPQ. Pokazano je da su bakar-ovisne aminske oksidaze u kojima je bakrov ion zamijenjen kationom cinka inaktivne[70] te je u takvoj strukturi umjesto kofaktora TPQ uočen neprocesirani tirozin.[71] Dodatna dva metalna centra u svakoj podjedinici enzima zauzimaju kationi kalcija koji imaju strukturnu ulogu. Ligandi za koordinaciju kationa Ca^{2+} su atomi kisika iz karboksilnih skupina tri aspartata (Asp519, Asp521, Asp664), zatim karbonilni kisik iz Leu520 i Leu665 te jedna molekula vode, a koji skupa osiguravaju oktaedarsku geometriju. Drugi kation kalcija je koordiniran s jednom molekulom vode, te bočnim ograncima aminokiselina Asn656 i Glu658 te s oba kisika iz karboksilne skupine Glu562 i karbonilom iz okosnice Phe653. Aminokiseline koje koordiniraju katione kalcija su očuvane. Enzim DAO ima pet disulfidnih mostova, 4 su formirana intramolekulski između Cys391-Cys417 te između Cys177-Cys181, dok je peti intermolekulski između Cys736 jedne podjednice i Cys736 iz druge podjedinice što kovalentno spaja homodimer. Pretpostavlja se da je uloga ovih disulfidnih mostova u stabilizaciji nestrukturiranih petlji. Međutim, određeni autori smatraju da bar jedan disulfidni most enzima DAO može funkcionirati kao redoks prekidač (engl. *redox switch*).[72]



Slika 8. Formiranje 2,4,5-trihidroksifenilalanin-kinona kod DAO spontanom oksidacijom tirozina u prisutnosti kationa Cu^{2+} i kisika.

2.5. Farmakološki značaj enzima MAO B i DAO

Histamin u hrani nastaje pomoću mikroorganizama u metabolizmu histidina te se u velikim količinama može naći u siru, alkoholnim pićima te fermentiranoj i konzerviranoj hrani. Pored endogeno sintetiziranog histamina u stanicama, kod čovjeka, histamin dolazi i iz prehrane, ali i crijevne bakterije također mogu doprinijeti povećanoj koncentraciji histamina. Višak histamina brzo se inaktivira pomoću enzima DAO koji je prisutan u probavnom sustavu. Glavni razlog intolerancije na histamin kod ljudi je smanjena razgradnja histamina uslijed snižene aktivnosti DAO ili povećane permeabilnosti crijeva, koja je karakteristična za osobe s ulceroznim kolitisom ili Crohnovom bolesti. Povećana koncentracija histamina kod ljudi vodi probavnim poremećajima te neželjenim simptomima kao što su hipotenzija, glavobolja, svrbež i crvenilo, a koji se javljaju nakon unosa hrane bogate histaminom. Liječenje intolerancije na histamin podrazumijeva prehranu bez histamina, uzimanje vitamina C i B6 koji mogu poboljšati aktivnost enzima DAO. Treba izbjegavati lijekove koji mogu potaknuti oslobađanje histamina ili inhibirati DAO. Na tržištu postoji i nadomjestak enzima DAO pod nazivom DAOSIN®, koji regulira razinu histamina na način da nadopunjuje količinu probavnog enzima diamin-oksidaze te tako na prirodni način regulira manjak enzima. Iz navedenih razloga, bitno je razumjeti mehanizam razgradnje histamina enzimom DAO kako bi se mogli pripremiti poboljšani preparati koji bi pomogli osobama s intolerancijom na histamin.

S druge strane, enzim MAO B ima centralno farmakološko mjesto u istraživanjima vezanim uz neurodegenerativne bolesti[73-76] s obzirom na to da je primarno uključen u razgradnju brojnih aminskih neurotransmitera poput dopamina, serotonina, adrenalina i noradrenalina u mozgu. Neuravnoteženost koncentracije spomenutih aminskih neurotransmitera ključni je uzrok nastanka Parkinsonove bolesti, a koja se primarno povezuje s nedostatkom neurotransmitera dopamina u dijelu mozga odgovornom za kontrolu voljno koordiniranih pokreta. Zbog toga inhibitori enzima MAO B mogu produžiti poluživot dopamina te se upravo takvi inhibitori koriste kao lijekovi u ranim fazama Parkinsonove bolesti ili kao dodatna terapija kod pacijenata koji se tretiraju levodopom, spojem koji se u mozgu direktno pretvara u dopamin te na taj način nadoknađuje nedostatak fiziološkog dopamina. Za sada su odobrena samo dva inhibitora enzima MAO B za kliničku upotrebu, rasagilin i selegilin. Međutim, potreba za lijekovima koji mogu regulirati koncentracije neurotransmitera u mozgu je iznimno velika. U svjetlu toga, poznavanje katalitičkog mehanizma enzima MAO B nije samo od znanstvenog, nego i praktičnog interesa te može poslužiti u poboljšanju tretmana simptoma te kvalitete života osoba koje pate od neurodegenerativnih bolesti.

§ 3. TEORIJSKI DIO

Računalne metode služe za proučavanje strukture, dinamike i svojstava sustava koji se sastoje od samo nekoliko desetaka atoma pa do velikih biomakromolekula koje sadrže i na stotine tisuća atoma.

U računalnoj kemiji ulazni podaci su struktura sustava kojeg proučavamo. Za male molekule u suštini nije neophodno imati eksperimentalno riješenu strukturu s obzirom na to da ju možemo izgraditi korištenjem dostupnih programa. Naravno, ukoliko je riječ o kompliciranijim strukturama ili kompleksima odgovarajuća struktura se može potražiti u bazi podataka CSD (engl. *Cambridge structural database*). S proteinima je međutim kompliciranije s obzirom na to da na temelju aminokiselinskog slijeda ne možemo pretpostaviti trodimenzionalnu strukturu proteina te nam je za modeliranje biomakromolekula neophodna eksperimentalno riješena struktura. Međutim, u nekim slučajevima, ukoliko protein od interesa nema riješenu strukturu, ali postoji struktura njegovog homologa s kojim dijeli bar 60 % istih ili sličnih aminokiselina u primarnoj strukturi, možemo na temelju strukture homologa izgraditi model proteina koji nas interesira. Naravno, što je veća sličnost između ta dva proteina, to je veća i pouzdanost izgrađenog modela.

Pri računalnom modeliranju koriste se metode različitog stupnja složenosti: empirijske u koje spadaju metode molekulske mehanike (MM) i molekulske dinamike (MD), semiempirijske, kvantno-mehaničke (QM) te njihova međusobna kombinacija.

3.1. Empirijske metode

Empirijske metode opisuju molekulu kao skup atoma koji se ponaša po zakonima klasične fizike. Potencijalna energija molekule je funkcija položaja jezgri, pri čemu se elektroni ne promatraju eksplicitno već se različitim parametrima opisuju njihovi efekti. U empirijske metode spadaju metode molekulske mehanike i molekulske dinamike.

3.1.1. Molekulska mehanika

Polje sila je termin za funkciju potencijalne energije sustava koje podrazumijeva skup parametara za opis različitih tipova atoma te funkciju koja omogućava računanje potencijalne energije molekule na temelju njezine geometrije. Parametri se obično dobivaju iz kvantno-mehaničkih računa ili usuglašavanjem s eksperimentalnim podacima dobivenim korištenjem neutronske defrakcije, difrakcije rentgenskih zraka, NMR-a, Ramanove spektroskopije i sl. Osnovna pretpostavka za korištenje polja sila je *prenosivost parametara* što znači da su parametri uvijek isti za isti *tip* atoma u različitim molekulama. Dakle, skup parametara za opis metilne skupine je isti u svim molekulama koje sadrže metilnu skupinu. Ukoliko ne bi vrijedila pretpostavka *prenosivosti parametara,* trebali bismo svaki put iznova razviti nove parametre za svaku metilnu grupu u molekulama čija svojstva želimo ispitati. Koncept *tipa atoma* je jednako važan i odnosi se na hibridizacijsko stanje i naboj za određenu vrstu atoma. Za primjer možemo uzeti ugljik koji može biti sp^3, sp^2 ili sp hibridiziran tj. može formirati jednostruku, dvostruku ili trostruku vezu ili može biti dio aromatskog prstena, te ovisno o hibridizaciji postoji više različitih tipova ugljikovih atoma koji se različito ponašaju.

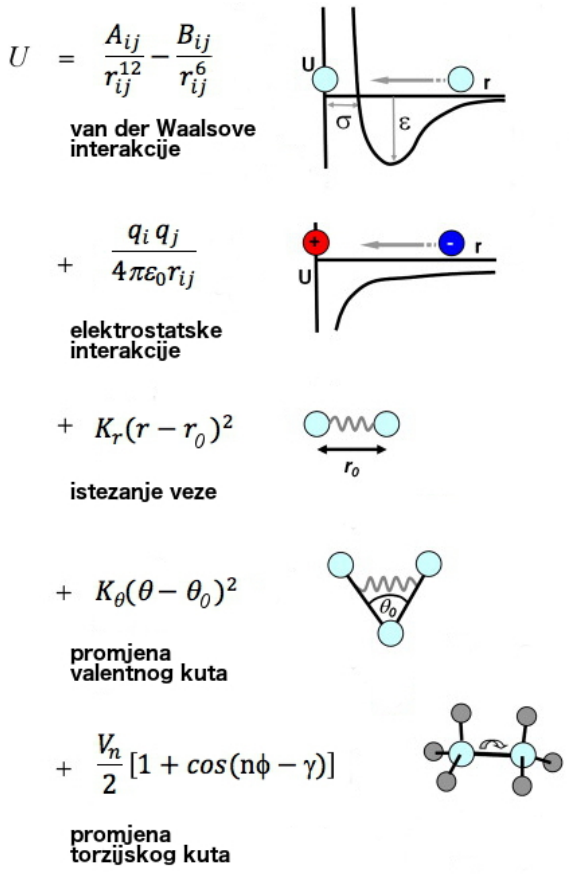
Funkcija kojom se računa potencijalna energija molekule sastoji se od niza potencijala (Slika 9) koji se javljaju kao posljedica odstupanja internih koordinata poput veza i kutova od njihovih referentnih vrijednosti, te neveznih interakcija kao što su elektrostatske koje se računaju korištenjem Coulombovog zakona i van der Waalsove koje se opisuju Lennard-Jonesovom funkcijom.

3.1.1.1. Polje sila

Kada koristimo polje sila za sve atome (engl. *all-atom force field*) svaki atom je predstavljen kao zasebna čestica kojoj su dodijeljeni naboj, masa i van der Waalsov radijus. Postoji veliki broj polja sila dostupnih u literaturi, međutim tipični izraz za polje sila ima sljedeću formu (2.1.):

$$V(r^N) = \sum_{\text{veze}} K_r(r - r_0)^2 + \sum_{\text{kutovi}} K_\theta(\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{torzije}} \frac{V_n}{2}[1 + \cos(n\phi - \gamma)] + \sum_{i<j}[\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^{6}} + \frac{q_i\, q_j}{4\pi\varepsilon_0 r_{ij}}] \quad (2.1)$$

Članovi u izrazu za potencijalnu energiju prikazani su na Slici 9.



Slika 9. Komponente u izrazu za potencijalnu energiju molekule (prerađeno i preuzeto iz [77]).

Prva tri člana izraza (2.1) definiraju duljine kovalentnih veza, kuteve i torzije, dok se posljednja dva odnose na nevezne interakcije. Prvi član izraza (2.1) odnosi se na opis kovalentne veze koja se između para atoma modelira najčešće harmoničkim potencijalom koji je definiran Hookovim zakonom. Ovaj član doprinosi promjeni energije sustava zbog odstupanja duljine veze r od referentne vrijednosti r_0, $(r - r_0)$. K_r je konstanta sile izražena u kcal mol^{-1} Å^{-2}. U nekim slučajevima, za realističniji opis veze prilikom velikog istezanja, umjesto harmoničkog može se koristiti složeniji anaharmonički (Morseov) potencijal[78] (2.2), gdje je D energija disociranja molekule, a parametar α ovisi o atomu i predstavlja konstantu sile. Morseov potencijal tako zahtjeva tri parametra za opis istezanja kovalentne veze (D, α, r_0), za razliku od harmoničkog potencijala koji zahtjeva samo dva (K_r, r_0). Eksponencijalni izraz Morseovog potencijala čini račune zahtjevnijima u usporedbi s izračunima istezanja veze koje je definirano harmoničkim potencijalom.

$$V_{Morse} = D\left\{e^{-\alpha(r-r_0)} - 1\right\}^2 - D \qquad (2.2)$$

Kako su konstante sile za istezanje veze (K_r) općenito velike, u molekulsko-mehaničkim računima gotovo nikada ne dolazi do značajnog odstupanja duljine veze od referentne vrijednosti. Stoga je opis istezanja kovalentne veze harmoničkim potencijalom dovoljan za proučavanje sustava od interesa.

Drugi član u izrazu (2.1) odnosi se na promjenu potencijalne energije sustava do koje dolazi uslijed odstupanja valentnog kuta (θ), kojeg tvore tri kovalentno povezana atoma, od njegove referentne vrijednosti (θ_0). Treći član je periodička funkcija koja opisuje promjenu potencijalne energije sustava nastalu uslijed promjene torzijskog kuta između četiri kovalentno povezana atoma, a prikazuje se kao rotacija oko središnje veze (Slika 9). V_n je rotacijska barijera (amplituda funkcije), parametar n kontrolira periodičnost, ϕ je vrijednost torzijskog kuta, a γ predstavlja točke minimuma torzijskog potencijala. Četvrti doprinos u izrazu (2.1) je nevezni doprinos potencijalnoj energiji sustava i odnosi se na sve atome koji nisu međusobno povezani kovalentnom vezom, odnosno parovi atoma koji su razdvojeni s najmanje tri kovalentne veze u nizu. Elektrostatske interakcije sustava računaju se kao zbroj interakcija između atoma i i j s parcijalnim nabojima q_i, q_j, gdje je r_{ij} udaljenost između atoma i i j, a ε_0 je dielektrična konstanta. Kako naboj na atomu nije eksperimentalno mjerljiv, parcijalni naboji trebaju biti pripisani atomima na isti način kao što se pripisuju parametri za opis kovalentne veze. Parcijalni naboji se općenito dobivaju usuglašavanjem (engl. *fitting*) s nabojima dobivenim iz kvantno-

mehaničkih računa. Van der Waalsove interakcije su kratkog dometa i opisane su pomoću Lennard-Jonesovog potencijala (2.3)[79]

$$V(r) = \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^{6}} \qquad (2.3)$$

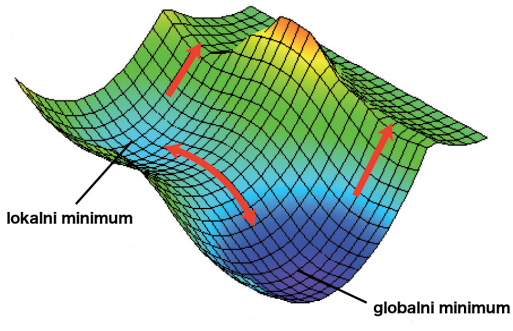
gdje $A = \varepsilon r_m^{12}$ i $B = 2\varepsilon r_m^6$ sadrže dva podesiva parametra koja ovise o vrsti atoma, a to su dubina potencijalne jame ε i položaj minimuma energije r_m.

Nevezne interakcije su računalno najzahtjevniji aspekt molekulsko-mehaničkih računa. Zbog toga bi smanjenje broja neveznih interakcija imalo značajan utjecaj na brzinu izvođenja MM računa. Kako se van der Waalsove interakcije između atoma značajno smanjuju sa povećanjem udaljenosti između atoma moguće je ograničiti domet na kom će se računati Lenard-Jonesov potencijal bez uvođenja značajnije greške u dobivene rezultate. S druge strane, elektrostatske interakcije su dugog dometa te ograničavanje udaljenosti na kom će se one računati može dovesti do pogrešnog opisa sustava od interesa. Udaljenost kojom se definira domet neveznih interakcija (engl. *cut-off value*) može se odrediti procjenjivanjem energije sustava za niz različitih vrijednosti ograničenja. Kada energija sustava počne konvergirati tada smo sigurni da nismo unijeli grešku u izračun potencijalne energije sustava. Tipične vrijednosti za ograničenje su između oko 10 Å, s tim što veće vrijednosti za ograničenje rezultiraju sporijim provođenjem izračuna. Korištenje periodičnih rubnih uvjeta (engl. *periodic boundary conditions,* PBC) postavlja granicu za vrijednost maksimalnog ograničenja na polovicu najkraće stranice kutije za simuliranje. Tretiranje interakcija dugog dometa, poput elektrostatskih interakcija, predstavlja problem s obzirom na to da njihov domet često nadmašuje polovicu dužine simulacijske kutije. Međutim, korištenjem Ewaldove sumacije[80] moguće je postići da svaka čestica interagira sa svim česticama u centralnoj simulacijskoj kutiji kao i sa svim replikama te simulacijske kutije (vidjeti 3.1.3.1). Elektrostatske interakcije se računaju između atoma u okviru centralne kutije pomoću standardnog Coulombovog izraza (Slika 9), dok se interakcije između atoma u centralnoj simulacijskoj kutiji i onih atoma u replikama centralne simulacijske kutije računaju na isti način pri čemu je udaljenost korigirana za odgovarajući translacijski vektor *n*. Doprinosi ukupnoj elektrostatskoj energiji dolazi iz interakcija u okviru centralne simulacijske kutije zajedno sa interakcijama između centralne kutije i svih njenih replika, a najčešće korištena metoda za tretiranje dalekosežnih elektrostatskih interakcije je PME[81] (engl. *particle mesh Ewald,* PME).

Danas postoji niz suvremenih polja sila razvijenih za različite vrste molekula, a njihova specifičnost ogleda se u funkciji kojom se opisuje energija sustava te o skupu atoma za koje je provedena parametrizacija. Općenita polja sila posjeduju parametre za veliki broj tipova atoma, kao što su CHARMM općenito polje sila[82] *(engl. CHARMM general force field)* ili općenito AMBER polje sila[83] *(engl. general AMBER force field, GAFF)*, dok su specijalizirana polja sila optimizirana za određenu skupinu spojeva, poput GLYCAM06 polja sila[84] dizajniranog za simuliranje ugljikohidrata.

3.1.1.2. Pretraživanje plohe potencijalne energije molekulskom mehanikom

Molekulska mehanika može se koristiti za pronalazak minimuma energije molekule na plohi potencijalne energije (Slika 10) odnosno za optimizaciju geometrije molekule te u molekulsko-dinamičkim simulacijama. Optimizacija geometrije makromolekulskih sustava provodi se pomoću matematičkih metoda minimizacije energije koje podrazumijevaju prve derivacije funkcije za energiju. Najčešće su u upotrebi metoda najstrmijeg spusta (engl. *steepest descents method*) i metoda konjugiranih gradijenata (engl. *conjugate gradients minimisation*). Postupak optimizacije geometrije podrazumijeva mijenjanje pojedinih internih koordinata molekule dok se ne pronađe odgovarajući minimum (Slika 10).



Slika 10. Prikaz trodimenzionalne plohe potencijalne energije s označenim lokalnim i globalnim minimumom.

Kod metode najstrmijeg spusta sustav se pomiče u pravcu koji je paralelan sa silom, odnosno sustav se spušta "nizbrdo" u pravcu negativnog gradijenta. Ova metoda se koristi u slučajevima kada je sustav daleko od minimuma kako bi se ugrubo odredio položaj minimuma.

Međutim, blizu minimuma ova metoda je neefikasna s obzirom na lošu konvergenciju. Zbog toga se u prvim koracima minimizacije koristi metoda najstrmijeg spusta nakon čega slijedi upotreba metode konjugiranih gradijenata kako bi se odredio lokalni minimum energije molekule.

Nelinearna molekula koja se sastoji iz N broja atoma ima ukupno 3N-6 stupnjeva slobode u trodimenzionalnom prostoru. Ploha potencijalne energije je funkcija 3N Cartesijevih koordinata zbog čega je vizualizacija potpune plohe potencijalne energije nemoguća već se u praksi vizualizira mali dio plohe koja predstavlja energiju kao funkciju najviše tri koordinate. Na primjer, ukoliko želimo proučavati cijepanje ili nastanak kovalentne veze onda se energija može prikazati u ovisnosti o rastojanju između atoma povezanih danom kovalentnom vezom. Također, potencijalna energija sustava može biti istodobno u funkciji duljine kovalentne veze i određenog kuta. Molekulsko modeliranje obično se tiče minimuma i sedlastih točki na plohi potencijalne energije s obzirom da su to regije od kemijskog interesa. Minimumi energije odgovaraju stabilnim strukturama dok sedlaste točke, koje povezuju dane minimume, odgovaraju prijelaznoj strukturi. Međutim, biološki sustavi se gotovo nikad ne nalaze u globalnom minimumu već uglavnom postoje u lokalnom minimumu koji odgovara fiziološkom stanju. Stoga, svrha molekulske dinamike je ispitivanje plohe potencijalne energije oko određenog lokalnog minimuma u kom se sustav nalazi tako da lociranje globalnog minimuma u suštini nije neophodno. Metode minimizacije obično se koriste za dobivanje pogodnih početnih struktura za molekulsko-dinamičke simulacije. Kristalne strukture biomakromolekula odgovaraju stabilnom stanju sustava međutim potrebno je dodati molekule otapala, zatim vodike te odgovarajući supstrat u aktivnom mjestu prije nego krenemo s molekulsko-dinamičkim simulacijama. U tom slučaju, minimizacija se koristi kako bismo dozvolili strukturi proteina da se relaksira, odnosno prilagodi novim uvjetima kako bismo ju pripremili za simulacije MD.

3.1.1.3. Model otapala u molekulskoj mehanici

Modeli vode koji se koriste u molekulskoj mehanici mogu se razvrstati u tri grupe, jednostavni rigidni model, model koji uključuje fleksibilnost do određene mjere i model koji eksplicitno uzima u obzir polarizacijske efekte. Najčešće se upotrebljava jednostavni rigidni model vode kod koga ne dolazi do deformiranja veza ili kutova. U ovaj model vode se ubrajaju modeli vode TIP3P[85] i SPC,[86] koji su međusobno veoma slični, odnosno razlikuju se samo u svojim geometrijama, nabojima i Lennard-Jonesovim parametrima. U ovom radu korišten je model vode TIP3P čiji su parametri prikazani u Tablici 2.

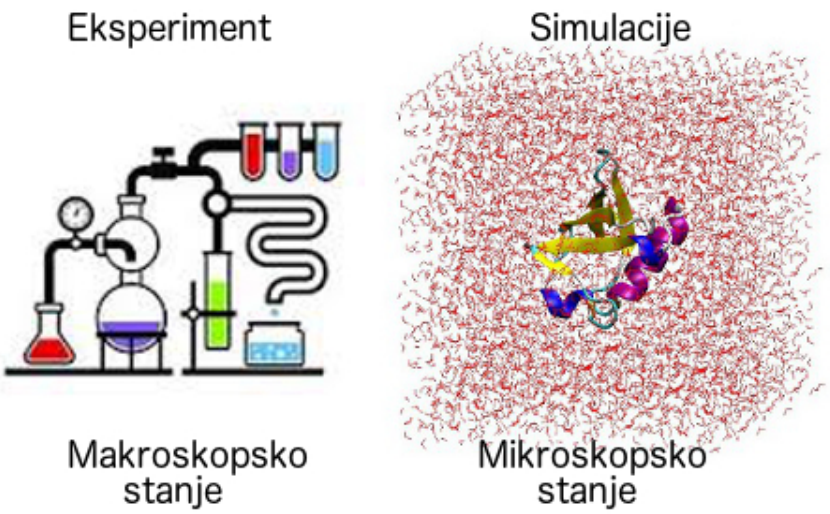
Tablica 2. Parametri za TIP3P model vode.

σ / Å	ε / kJ mol^{-1}	I_1 / Å	q_1 / e	q_2 / e	θ / °
3,15061	0,6364	0,9572	+0,4170	-0,8340	104,52

σ i ε su Lennard-Jonesovi parametri, σ je van der Waalsov radijus, odnosno udaljenost na koju se mogu približiti dvije čestice koje međusobno nisu povezane kovalentnom vezom, a ε je dubina minimuma potencijalne energije.

3.1.2. Statistička mehanika

U računalnim simulacijama želimo ispitati makroskopska svojstva sustava kroz mikroskopske simulacije, na primjer želimo izračunati promjenu slobodne energije vezanja ili želimo ispitati mehanizam konformacijskih promjena. Veza između mikroskopskih simulacija i makroskopskih svojstava (Slika 11) osigurana je kroz statističku mehaniku koja koristeći matematičke izraze povezuje makroskopska svojstva sa raspodjelom i gibanjem atoma i molekula u sustavu s *N* tijela.



Slika 11. Prikaz makroskopskog i mikroskopskog stanja.

Statistička mehanika za cilj ima predviđanje makroskopskih fenomena kroz svojstva individualnih molekula koji čine sustav koji simuliramo. Sustav može podrazumijevati skup molekula otapala do solvatiranih protein-protein ili protein-DNA kompleksa. Kako bismo povezali makroskopski sustav s mikroskopskim, koristi se vremenski ovisno statističko uprosječivanje. Mikroskopsko stanje sustava je definirano položajem i momentom u multidimenzionalnom prostoru koji se naziva *fazni prostor*. Za sustav s *N* brojem čestica, ovaj fazni prostor ima 6N dimenzija. Čestica u faznom prostoru opisuje stanje sustava, dok je ansambl kolekcija čestica u faznom prostoru koje odgovaraju istom termodinamičkom stanju.

Eksperimenti se rade na makroskopskim kemijskim sustavima koji se sastoje iz velikog broja molekula, na razini Avogadrovog broja ($6{,}022\times10^{23}$), gdje molekule mogu zauzimati veliki broj različitih konformacija. U statističkoj mehanici, prosječne vrijednosti koje odgovaraju eksperimentalnoj opservabli su definirane prosjekom ansambla, odnosno eksperimentalno izmjereno svojstvo bilo kog sustava jednako je vrijednosti uprosječenoj preko svakog člana ansambla. Prosjek ansambla je prikazan sljedećom formulom:

$$\langle A\rangle_{ansambla} = \iint dp^N dr^N A(p^N, r^N)\rho(p^N, r^N) \qquad (2.4)$$

gdje je $A(p^N, r^N)$ svojstvo koje pratimo u funkciji momenta, p i položaja r sustava.
Vjerojatnost gustoće ansambla je izražena:

$$\rho(p^N, r^N) = \frac{1}{Q}\exp[-H(p^N, r^N)/k_B T] \tag{2.5}$$

Gdje H predstavlja Hamiltonijan, T je temperatura, k_B Boltzmannova konstanta, a Q je particijska funkcija (2.6).

$$Q = \iint dp^N dr^N \exp[-H(p^N, r^N)/k_B T] \tag{2.6}$$

Particijsku funkciju gotovo je nemoguće riješiti jer se moraju uzeti u obzir sva moguća stanja sustava. Zato se u molekulsko-dinamičkim simulacijama (vidjeti 2.1.6) promatraju točke ansambla uzastopno u vremenu kako bi se izračunao prosjek ansambla. Dakle, molekulsko-dinamičke simulacije moraju sustav provesti kroz sva moguća stanja u zadanom termodinamičkom sustavu, odnosno potrebno je odrediti vremenski prosjek ansambla, A:

$$\langle A \rangle_{\text{vrijeme}} = \lim_{\tau\to\infty} \frac{1}{\tau} \int_{t=0}^{\tau} A(p^N(t), r^N(t))dt \approx \frac{1}{M}\sum_{t=1}^{M} A(p^N, r^N) \tag{2.6}$$

Gdje je t simulacijsko vrijeme, M je broj koraka, a $A(p^N, r^N)$ je trenutna vrijednost A. Dakle, primjenom molekulsko-dinamičkih simulacija može se izračunati vremenski prosjek ansambla, uz pretpostavku da svojstva izračunata eksperimentom odgovaraju vremenskom prosjeku ansambla. Ova pretpostavka je temelj *Ergodske hipoteze*[87] prema kojoj svojstva dobivena praćenjem jedne molekule tijekom dovoljno dugog razdoblja, odgovara raspodjeli u sustavu s velikim brojem istovrsnih molekula:

$$\langle A \rangle_{ansambl} = \langle A \rangle_{vrijeme} \tag{2.7}$$

prosjek ansambla = vremenski prosjek

Osnovna ideja je da ukoliko dovoljno dugo simuliramo sustav, sustav će proći kroz sva moguća stanja. Jedan od ciljeva molekulsko-dinamičkih simulacija je generiranje dovoljno reprezentativnih konformacija sustava koji će vjerodostojno predstaviti gotovo sva moguća stanja u kojima se sustav može naći. Ukoliko u tome uspijemo, eksperimentalno dobiveni podaci koji se tiču strukturnih, dinamičkih i termodinamičkih karakteristika mogu biti i računalno izračunati. S obzirom na to da je dužina simulacija ograničena veličinom sustava

odnosno dostupnom moći računala, moramo biti sigurni da smo uspjeli uzorkovati dovoljnu količinu faznog prostora.

Najčešće korišteni ansambli su kanonski ansambl, kod kog su broj čestica *N*, volumen *V* i temperatura *T* konstantni, zatim mikrokanonski ansambl (NVE) te izobarno-izotermalni ansambl (NpT). Na uobičajenim temperaturama i gustoći, fluktuiranje svojstava svakog od ovog ansambla postaje zanemarivo. Ovi ansambli zato mogu pouzdano opisati svojstva makrosustava.

Veza između ovih ansambla i termodinamike je prirodni logaritam particijske funkcije za svaki od ansambla. Particijske funkcije gore navedenih ansambla su:

$$\begin{aligned} &\textit{Kanonski ansambl} && \mathrm{Q}(N,V,T) = \textstyle\sum_E \Omega\,(N,V,E)\,\exp\,(-\beta E) \\ &\textit{Mikrokanonski ansambl} && \Omega(N,V,E) = \omega(E) \\ &\textit{Izobarno-izotermalni ansambl} && \Delta(N,p,T) = \textstyle\sum_V Q\,(N,V,T)\,\exp\,(-\beta pV) \end{aligned} \tag{2.8}$$

U navedenim particijskim funkcijama ω je ukupni broj stanja s danom energijom, β je $1/k_BT$. Logaritam particijske funkcije za svaki ansambl je direktno proporcionalan termodinamičkoj funkciji, a veze su dane u jednadžbama 2.9.

$$\begin{aligned} &\textit{Kanonski ansambl} && A = -kT \ln (Q\,(N,\,V,\,T)) \\ &\textit{Mikrokanonski ansambl} && S = k \ln (\Omega(N,V,E)) \\ &\textit{Izobarno-izotermalni ansambl} && G = -kT \ln (\Delta(N,p,T)) \end{aligned} \tag{2.9}$$

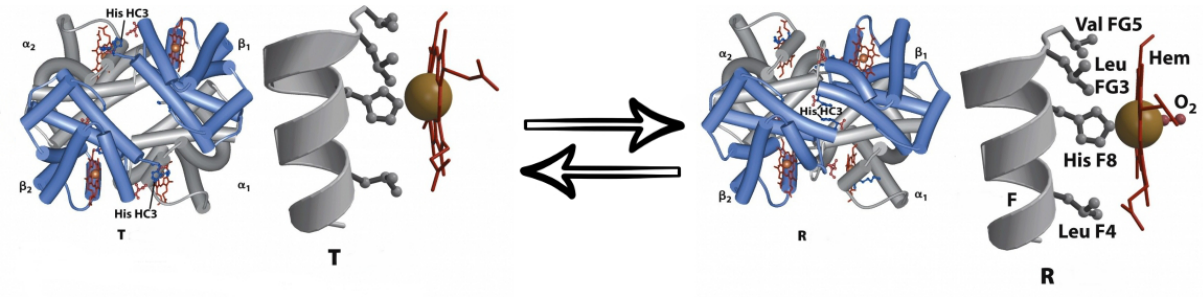
Dakle, uz pomoć particijske funkcije koja povezuje statističku mehaniku s klasičnom termodinamikom, statistička mehanika može objasniti makroskopsku termodinamiku iz mikroskopskog sustava. Stoga, izazov u računalnoj kemiji je upravo kako efikasno izračunati particijsku funkciju. Kako je gotovo nemoguće izračunati gore navede sume (2.8), particijske funkcije se procjenjuju koristeći reprezentativne uzorke koji predstavljaju željenu distribuciju svojstva. Strategije generiranja takvih uzoraka se nazivaju uzorkovanje (engl. *sampling*), a dva najpoznatija pristupa uzorkovanja su simulacije Monte Carlo i simulacije molekulske dinamike. Molekulsko-dinamičke simulacije generiraju sekvencu točaka koje pripadaju istom ansamblu u faznom prostoru, ali u funkciji vremena. U izradi ove doktorske disertacije korištena je molekulska dinamika.

3.1.3. Molekulska dinamika

Molekulska dinamika (MD) je računalna metoda pomoću koje se simulira vremenski ovisno gibanje atoma kako bi se opisalo ponašanje molekula u realnom sustavu. Ova metoda danas se rutinski koristi u proučavanju strukturnih, dinamičkih i termodinamičkih svojstava bioloških molekula i njihovih kompleksa. Prva molekulsko-dinamička simulacija proteina izvedena je na malom proteinu u vakuumu, inhibitoru tripsina iz gušterače goveda (engl. *bovine pancreatic trypsin inhibitor*, BPTI)[88] koji se sastoji iz 58 aminokiselina (~1000 atoma) i iznosila je svega 9,2 ps, a danas se izvode molekulsko-dinamičke simulacije kapsida virusa[89] (~1500000 atoma) na μs vremenskoj skali.

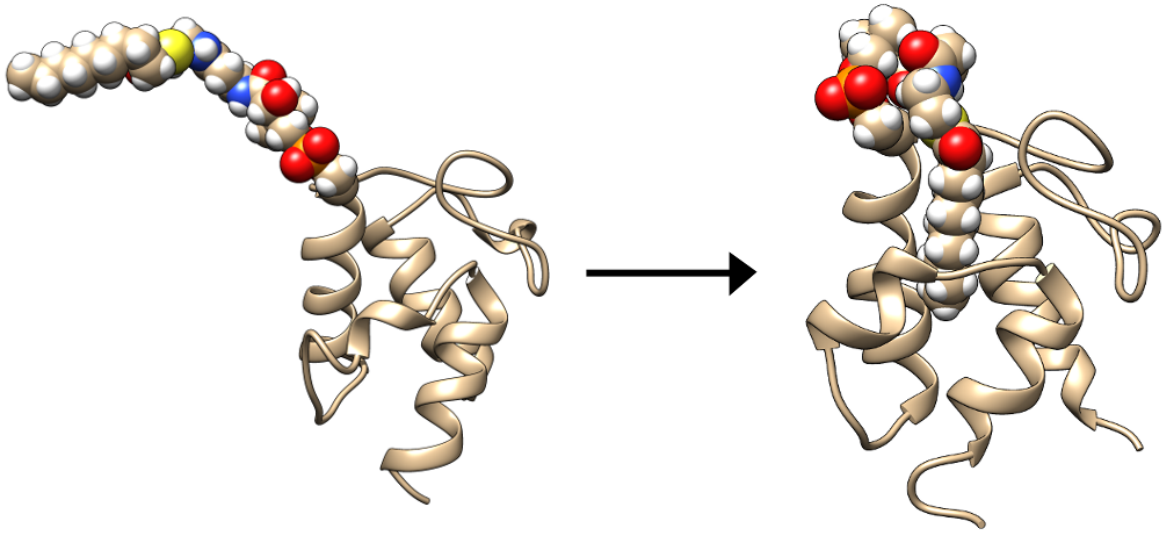
Poznato je kako dinamika proteina često ima ključnu ulogu u njihovoj funkciji. Međutim, eksperimentalno riješenoj strukturi nedostaje dinamički aspekt te takva struktura nije u potpunosti informativna. Tradicionalni pristup u razumijevanju veze između različitih konformacija i funkcije je prikupljanje većeg broja eksperimentalno dobivenih struktura za jedan te isti protein, ali dobivenih u različitim kristalizacijskim uvjetima ili u kompleksu s različitim inhibitorima, analozima prijelaznog stanja i sl. Ovakav pristup rezultirao je velikim brojem struktura za isti protein te nije neuobičajeno pronaći na desetine različitih struktura za jednan protein pohranjenih u bazi podataka PDB.

Hemoglobin je primjer proteina gdje su konformacijske promjene bitne za funkciju prijenosa kisika. Naime, u deoksi hemoglobinu za koji je karakteristična konformacija T, željezo je izvan ravnine hema, međutim kada se veže kisik, željezo ulazi u ravninu hema te za sobom povlači His58 iz zavojnice F hemoglobina što dalje potiče istu konformacijsku promjenu u preostalim podjedinicama hemoglobina[90] (Slika 12).



Slika 12. Konformacijska promjena hemoglobina iz T u R pri vezanju kisika.

Primjer proteina nosača acila (engl. *acyl carrier protein*, ACP) također upućuje na važnost dinamike u funkciji proteina. ACP je važan protein koji sudjeluje u biosintezi masnih kiselina i poliketida. Sastoji se od četiri α uzvojnice koje formiraju hidrofobnu šupljinu u koju ACP smješta rastući acilni lanac kovalentno vezan za 4'-fosfopanteteinsku prostetičku skupinu. Na taj način se spriječava hidroliza acilnog lanca te se omogućava neometana biosinteza masnih kiselina. Upravo su molekulsko-dinamičke simulacije potvrdile kako se smještanje odvija između druge i treće uzvojnice te su vizualizirale čitav proces smještanja [91] (Slika 13).



Slika 13. Proces smještanja acilnog lanca vezanog za prostetičku skupinu u hidrofobnu šupljinu proteina ACP.

Stoga, molekulsko-dinamičke simulacije predstavljaju metodu izbora za proučavanje dinamike makromolekula. Veliki napredak u razvoju simulacijskih algoritama i računala postavio je koncept "ansambla struktura" ispred analize eksperimentalno dobivenih struktura pohranjenih u PDB bazi podataka. Iz analize ansambla mogu se dobiti termodinamička svojstva sustava, kao što je entropija ili Gibbsova energija vezanja, a ansambli se također mogu koristiti za proučavanje značajnih konformacijskih promjena te smatanja proteina. Molekulska dinamika se temelji na *Ergodskoj hipotezi*[87] prema kojoj svojstva dobivena praćenjem jedne molekule tijekom dovoljno dugog razdoblja, odgovara raspodjeli konformacija u sustavu s velikim brojem istovrsnih molekula.

Korištenje klasične mehanike i molekulske dinamike značajno smanjuje kompleksnost i zahtjevnost računa koji se koriste za simuliranje biomakromolekula. Nedostatak ovog pristupa

je nemogućnost proučavanja efekta elektrona te su računi ograničeni na opisivanje osnovnog stanja atoma. Stoga, ova metoda isključuje proučavanje kemijskih reakcija i drugih fenomena koji se karakteriziraju preraspodjelom elektronske gustoće.

Kako bi se izvodili molekulsko-dinamički računi neophodno je imati optimiranu (minimiziranu) strukturu biomakromolekule, polje sila koje će opisivati potencijalnu energiju sustava u ovisnosti od konformacije te odgovarajući algoritam koji će propagirati sustav kroz vrijeme.

Molekulska dinamika se temelji na Newtonovim jednadžbama gibanja kako bi se opisalo gibanje atoma tijekom vremena dok se interakcije između atoma opisuju poljem sila.

$$F_i = m_i a_i = m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} = \frac{dp_i}{dt} \tag{2.10}$$

$$\frac{d^2 x_i}{dt^2} = \frac{F_{x_i}}{m_i} \tag{2.11}$$

gdje je r_i pozicija čestice *i* mase m_i na koju djeluje sila F_i. Sila koja djeluje na svaki atom se izračunava deriviranjem izraza za potencijalnu energiju koja je opisana poljem sila. Promjena količine gibanja u vremenu $\vec{p} = m\vec{v}$, proporcionalna je sili i zbiva se u smjeru djelovanja te sile. Početni položaji atoma proteina definirani su početnom optimiranom strukturom, dok se početne brzine atomima proteina dodjeljuju korištenjem izraza za Maxwell-Boltzmannovu raspodjelu brzina na zadanoj temperaturi *T*:

$$p(v_{ix}) = \sqrt{\frac{m_i}{2\pi k_B T}} e^{-\frac{m_i v_{ix}^2}{2k_B T}} \tag{2.12}$$

Međutim opisivanje gibanja molekula rezultira složenim, međusobno zavisnim jednadžbama, s obzirom na to da sila koja djeluje na atom u molekuli, ovisi o položaju tog atoma, ali i o položaju svih drugih atoma s kojima dani atom interagira. Ovakav tip gibanja je stoga nemoguće riješiti analitički već je potrebno primijeniti numeričku integraciju pri čemu se funkcije razvijaju u Taylorov red. Tako postoje brojni algoritmi za rješavanje diferencijalnih jednadžbi koje proizlaze iz Newtonovog zakona gibanja, a u najširoj upotrebi je Verletov algoritam[92] koji računa položaj i brzinu čestica na sljedeći način:

$$\vec{x}(t+\Delta t) = \vec{x}(t) + \vec{v}(t)\Delta t + \frac{1}{2}\vec{a}(t)\Delta t^2 \qquad (2.13)$$

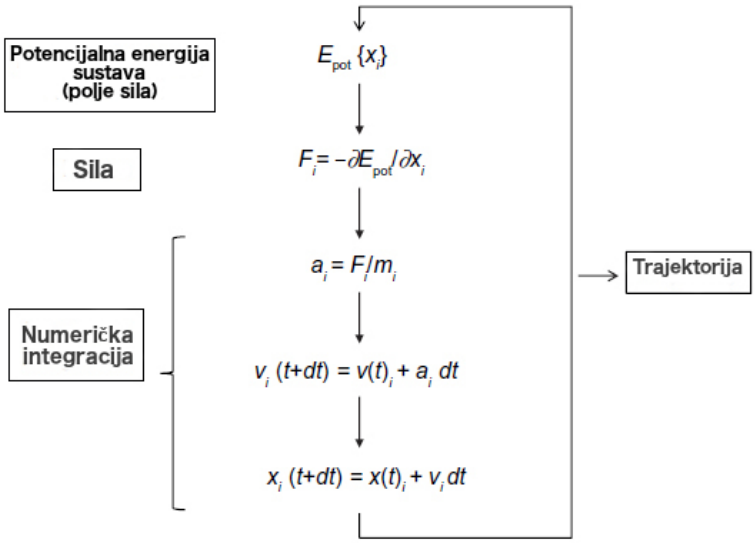
gdje je Δt integracijski korak, $\vec{x}(t)$ je vektor položaja čestice, dok su brzina, $\vec{v}$ i ubrzanje $\vec{a}$ prva i druga derivacija položaja x u vremenu. Vektor brzina definiran je izrazom:

$$\vec{v}(t+\Delta t) = \vec{v}(t) + \frac{1}{2}[\vec{a}(t) + \vec{a}(t+\Delta t)]\Delta t \qquad (2.14)$$

gdje je ubrzanje, $\vec{a}$ definirano sljedećim izrazom:

$$\vec{a}(t+\Delta t) = -\frac{1}{m}\nabla U[q(t+\Delta t)] \qquad (2.15)$$

Molekulska dinamika je deterministička metoda što znači da prethodno stanje definira sljedeće, odnosno kako bi se izračunale brzine u sljedećem koraku neophodne su sile u prethodnom koraku. Shematski prikazano, trajektorije u MD simulacijama se dobivaju na sljedeći način (Slika 14):

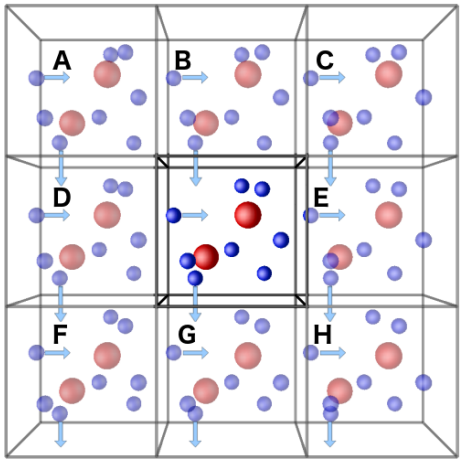


Slika 14. Shematski prikaz dobivanja trajektorija u molekulsko-dinamičkim simulacijama (preuzeto i prerađeno iz [93]).

Ukratko, deriviranjem izraza za potencijalnu energiju sustava, definiranu poljem sila, dobivaju se sile koje djeluju na atome sustava te iz drugog Newtonovog zakona dobiva se ubrzanje. Glavna pretpostavka je da su sila, a time i ubrzanje $\vec{a}$, konstantni u integracijskom koraku Δt što znači da Δt mora biti dovoljno malo kako bi dana pretpostavka vrijedila. U suštini, korak u numeričkoj integraciji je red veličine niži od perioda najfrekventnije vibracije unutar molekule. Kod biomakromolekula riječ je o C-H vibraciji koja iznosi približno 10^{-14} s, tako da Δt mora biti $\leq 10^{-15}$ s što odgovara 1 fs. Idealno, vremenski korak u simulacijama trebao bi biti što je moguće duži jer bi to omogućilo bolju pretragu faznog prostora. Međutim, preveliki vremenski bi omogućio atomima da se previše približe jedan drugom. Odbojna sila koja bi se izračunala u sljedećem koraku bila bi veoma velika što bi vodilo velikom ubrzanju, a onda i brzini, što može prouzročiti nerealne oscilacije sustava i rezultirati nestabilnim MD trajektorijama. Međutim, korištenje većeg integracijskog koraka od 1 fs koji bi omogućio efikasnije i brže računanje u praksi je omogućeno fiksiranjem duljina kovalentnih veza u kojima je jedan od atoma vodik, čime se najbrža gibanja u sustavu zamrznu na ravnotežnu vrijednost. Ovo je temelj algoritma SHAKE[94] čijom se primjenom omogućava korištenje većeg integracijskog koraka od 1 fs u MD simulacijama.

3.1.3.1. Periodični rubni uvjeti

Kako bismo što realističnije prikazali model proteina potreban je veliki broj molekula otapala u kome je dani protein otopljen. Samo postavljanje biomakromolekula u kutiju otapala ne predstavlja dovoljno dobar model s obzirom na to da će jedan broj molekula otapala biti na granici između proteina i ostatka otapala, neki će biti okruženi isključivo molekulama otapala dok će se velik broj molekula otapala naći na granici između kutije otapala i okolnog vakuuma. Kako bismo spriječili granične molekule otapala da "ishlape" te kako bismo uspjeli s relativno malim brojem molekula otapala reproducirati svojstva otapala neophodno je koristiti periodične rubne uvjete koji podrazumijevaju simuliranje sustava u centralnoj simulacijskoj kutiji koja se onda ponavlja u sve tri dimenzije tvoreći trodimenzionalni obrazac prikazan na Slici 15.



Slika 15. Shematski prikaz periodičnih rubnih uvjeta koji se koriste u molekulsko-dinamičkim simulacijama.

Primjenom periodičnih rubnih uvjeta osigurava se konstantan broj molekula tijekom simulacija. To se postiže tako da molekula koja iz centralne simulacijske kutije prelazi u kutiju G odmah biva zamijenjena svojom replikom iz kutije B, pri čemu se ovakvo kretanje ponavlja u svim pravcima (kutijama).

3.1.3.2. Priprema i pokretanje molekulsko-dinamičkih simulacija

Molekulsko-dinamičke simulacije obično se izvode u nekoliko uzastopnih koraka. U prvom koraku neophodno je pripremiti inicijalnu strukturu biomolekula kojeg želimo simulirati a zatim ju i minimizirati prije nego krenemo s MD simulacijama. Početne strukture, dobivene difrakcijom rendgenskih zraka na kristalima, krio-elektronskom mikroskopijom ili spektroskopijom NMR, preuzimaju se iz proteinske banke podataka PDB. Prvo se modeliraju dijelovi strukture koji nedostaju, dodaju se vodici, odgovarajući supstrat ili inhibitor te se sustav otapa. Takav sustav zatim se minimizira u nekoliko uzastopnih koraka kako bi se uklonili neželjeni kontakti dobiveni dodavanjem vodika, molekula otapala i odgovarajućeg spoja u aktivno ili vezno mjesto proteina. U sljedećem koraku sustav se zagrijava u kratkom periodu od oko 30 ps od 0 K do željene temperature u uvjetima NVT, pri čemu se početne brzine nasumično dodjeljuju atomima kroz Maxwell-Boltzmannovu raspodjelu. U trećem koraku provode se MD simulacije na temperaturi do koje se sustav zagrijao kao bi se uravnotežio na danoj temperaturi odnosno ekvilibrirao u uvjetima NPT prije nego krenemo sa MD simulacijama u kojima se generiraju ansambli koji će se kasnije analizirati u cilju proučavanja svojstava od interesa.

3.1.4. Račun Gibbsove energije vezanja

U računalnoj (bio)kemiji jedno od važnijih pitanja je pouzdano računanje Gibbsove energije vezanja malih molekula za biomakromolekule. Visoki afinitet određenog spoja za njegovu biološku metu osnovni je preduvjet za dizajn novih efikasnih i selektivnih lijekova. Nažalost, čak i kada su strukturne informacije dostupne, efekti otapala te konformacijske promjene proteina i liganda otežavaju pouzdano opisivanje procesa asocijacije liganda i makromolekula. Međutim, zahvaljujući napretku računala i računalnih algoritama računanje Gibbsove energije vezanja postalo je pouzdan alat koji se svakodnevno koristi u opisivanju supstratne selektivnosti uzimajući u obzir efekte otapala te promjenu entropije koja nastaje tijekom procesa asocijacije. Pored toga, jednako važno je uzeti u obzir kako se proteini konstantno gibaju te da postoje u stanicama u velikom broju konformacija koje međusobno imaju sličnu energiju. Pretpostavlja se kako protein postoji u velikom broju energetski sličnih konformacija te da se ligand selektivno veže za jednu od mnogih konformacija što dovodi do povećanja tog konformera u ukupnoj populaciji proteinskih konformacija. Danas postoji veliki broj računalnih metoda koje

se koriste za modeliranje interakcija između proteina i liganda, a koje se međusobno razlikuju po brzini i preciznosti u izračunu Gibbsove energije vezanja. Metode uklapanja (engl. *docking*) optimirane su da budu brze i koriste se za predviđanje najpovoljnije orijentacije male molekule kada se nalazi u kompleksu s drugom molekulom te se na temelju težinske funkcije (engl. *scoring function*) može predvidjeti afinitiet vezanja. Alkemijske i usmjerene (engl. *steered*) metode zasnivaju se na molekulsko-dinamičkim simulacijama u eksplicitnom otapalu i spadaju u najpouzdanije metode za računanje Gibbsove energije vezanja. Alkemijske metode, poput slobodne energije perturbacije (engl. *free energy perturbation,* FEP), se temelje na nefizičkom termodinamičkom ciklusu, gdje se relativna Gibbsova energija vezanja izračunava kroz niz koraka tijekom kojih se ligand postavlja ili uklanja iz različitih okruženja. Usmjerene metode se temelje na primjeni sile koja izvlači ligand iz proteina. Kao kompromis između brzine i točnosti u izračunu Gibbsove energije vezanja koristi se MM-PBSA (engl. *molecular mechanics Poisson-Boltzmanns surface area*) ili MM-GBSA metoda (engl. *molecular mechanics generalized Born surface area*).

U ovom radu korištena je metoda MM-PBSA[95] (engl. *molecular mechanics Poisson-Boltzmanns surface area*) za izračun Gibbsove energije vezanja supstrata za protein koja je implementirana u program AMBER.[96] Metoda MM-PBSA se provodi na prethodno dobivenim trajektorijama iz klasičnih MD simulacija. Ovom metodom, Gibsova energija vezanja, $\Delta G^{o}_{\text{vezanja}}$, se računa:

$$\Delta G^{o}_{\text{vezanja}} = \langle G^{o}_{(\text{kompleks})} \rangle - \langle G^{o}_{(\text{enzim})} \rangle - \langle G^{o}_{(\text{supstrat})} \rangle \qquad (2.16)$$

gdje simbol < > predstavlja vrijednost dobivenu na *n* broju struktura prethodno dobivenih u MD simulaciji. Gibbsova energija svakog od stanja (kompleks, enzim, supstrat) prikazuje se na sljedeći način:

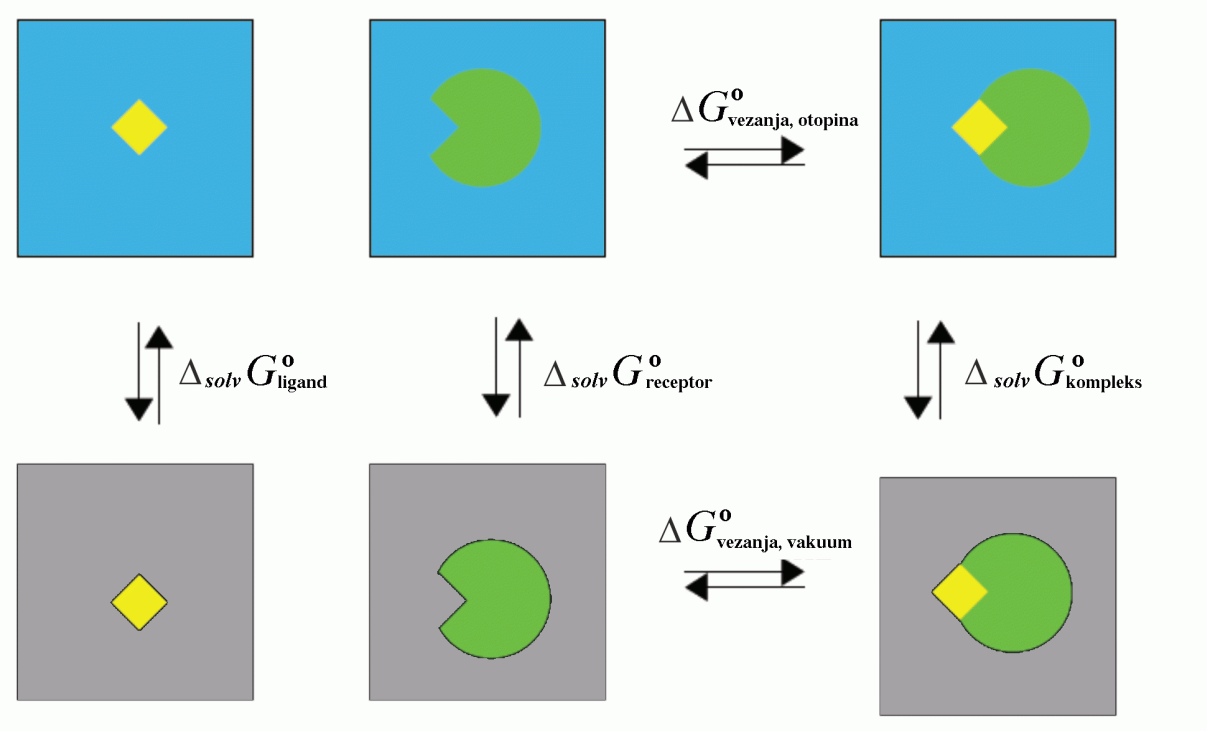
$$\Delta G^{o}_{(\text{kompleks/enzim/supstrat})} = \Delta E_{\text{MM}} + \Delta_{solv} G^{o} - \text{T}\Delta S^{o} \qquad (2.17)$$

gdje se ΔE_{MM} računa na molekulsko-mehaničkoj razini na temelju jednadžbe polja sila kao zbroj veznih i neveznih doprinosa (E_{veze}, E_{kutovi}, E_{torzije}, E_{ele}, E_{vdW}), Gibbsova energija solvatacije, $\Delta_{solv} G^{o}$, uključuje polarni i nepolarni doprinos. Polarni doprinos, ΔG^{o}_{PB}, računa se rješavanjem Poisson-Boltzmannove jednadžbe, dok se nepolarni doprinos Gibbsovoj energiji solvatacije

računa preko površine dostupne otapalu (*engl.* solvent accessible surface area, SASA), pomoću jednadžbe $\Delta G^{o}_{\text{nepolarni}} = \gamma \cdot \text{SASA} + \beta$, gdje su γ i β empirijski parametri. Gibbsova energija solvatacije, $\Delta_{solv}G^{o}$ i ΔE_{MM} skupa čine entalpijski doprinos Gibbsovoj energiji vezanja. Konformacijska entropija sustava se procjenjuje analizom normalnih modova na skupu struktura dobivenih iz MD simulacija. Ovaj doprinos (vibracijski, translacijski i rotacijski) se u praksi može zanemariti ukoliko se želi procijeniti samo relativni odnos Gibbsovih energija vezanja za slična stanja.

Gibbsova energija vezanja supstrata za enzim u otopini, $\Delta G^{\circ}_{\text{vezanja, otopina}}$, računa se korištenjem termodinamičkog ciklusa (Slika 16) kao suma Gibbsove energije vezanja supstrata za enzim u vakuumu ($\Delta G^{\circ}_{\text{vezanja, vakuum}}$) i razlike Gibbsovih energija solvatacije.

$$\Delta G^{o}_{\text{vezanja, otopina}} = \Delta G^{\circ}_{\text{vezanja, vakuum}} + \Delta_{solv}G^{o}_{(\text{kompleks})} - (\Delta_{solv}G^{o}_{(\text{receptor})} + \Delta_{solv}G^{o}_{(\text{ligand})}) \quad (2.18)$$



Slika 16. Termodinamički ciklus za računanje Gibbsove energije vezanja pomoću metode MM-PBSA (prerađeno i preuzeto iz [97]).

3.2. Kvantna mehanika

Zbog dvojne, valno-čestične prirode elektrona, zakoni klasične mehanike ne mogu vjerno opisati međudjelovanja čestica unutar molekula, tj. višeelektronskih sustava. Ponašanje elektrona u molekulama može se opisati uz pomoć metoda zasnovanih na kvantnoj mehanici. U kvantnoj mehanici sustav je opisan valnom funkcijom Ψ, koja se može odrediti rješavanjem Schrödingerove jednadžbe. Schrödingerova jednadžba za jednu česticu u svom vremenski ovisnom obliku glasi:

$$\left\{-\frac{\hbar^2}{2m}\left(\frac{\partial^2}{\partial x^2}+\frac{\partial^2}{\partial y^2}+\frac{\partial^2}{\partial z^2}\right)+V\right\}\Psi(r,t)=i\hbar\frac{\partial}{\partial t}\Psi(r,t) \qquad (2.19)$$

gdje je $\hbar$ reducirana Planckova konstanta ($\hbar=h/2\pi$), m masa čestice, a r njezin položaj u vremenu t pod utjecajem vanjskog polja V. Vremenski neovisna Schrödingerova jednadžba ima sljedeći oblik:

$$\left\{-\frac{\hbar^2}{2m}\nabla^2+V\right\}\Psi(r)=E\Psi(r) \qquad (2.20)$$

gdje je E vlastita vrijednost ukupne energije čestice, $-\frac{\hbar^2}{2m}\nabla^2$ je operator kinetičke energije, a V operator potencijalne energije. Laplacian, ∇^2, je matematički operator dvostrukog parcijalnog deriviranja po koordinatama x, y, i z:

$$\nabla^2=\frac{\partial^2}{\partial x^2}+\frac{\partial^2}{\partial y^2}+\frac{\partial^2}{\partial z^2} \qquad (2.21)$$

Lijevu stranu jednadžbe (2.20) možemo zapisati kao $\hat{H}\Psi$, gdje je $\hat{H}$ operator ukupne energije, Hamiltonijan. Tada se dobivamo reducirani oblik Schrödingerove jednadžbe:

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \qquad (2.22)$$

Za vremenski neovisni, višeelektronski sustav, Hamiltonijan $\hat{H}$ se prikazuje:

$$\hat{H} = -\sum_{\mathrm{A}}^{\text{jezgre}} \frac{1}{2M_A}\nabla_A^2 - \sum_{a}^{\text{elektroni}} \frac{1}{2}\nabla_a^2 - \sum_{\mathrm{A}}^{\text{jezgre}} \sum_{a}^{\text{elektroni}} \frac{Z_A}{r_{Aa}} + \sum_{\mathrm{A}}^{\text{jezgre}} \sum_{\mathrm{B}}^{\text{jezgre}} \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} + \sum_{a}^{\text{elektroni}} \sum_{\mathrm{b}}^{\text{elektroni}} \frac{1}{r_{ab}} \quad (2.23)$$

gdje M_A predstavlja masu jezgre A, a Z_A je njen naboj. R_{AB} su udaljenosti jezgara A i B, a r_{ab} je udaljenosti elektrona a i b. Prvi i drugi član u jednadžbi (2.23) odnose se na kinetičku energiju jezgara, odnosno elektrona. Preostala tri člana su coulombski potencijali koji se odnose na privlačenje jezgara i elektrona, međusobno odbijanje jezgara te odbijanja između elektrona. Operator ukupne energije stoga se može prikazati kao zbroj operatora kinetičke energije jezgara, kinetičke energije elektrona, privlačenja između jezgara i elektrona, odbijanja između jezgara i međuelektronskih repulzija:

$$\hat{H}_{ukupni} = T_n + T_e + V_{ne} + V_{nn} + V_{ee} \quad (2.24)$$

Za vremenski neovisnu Schrödingerovu jednadžbu moguće je dobiti egzaktno rješenje samo za najjednostavnije slučajeve, kao npr. za atom vodika. Međutim, dovoljno dobra rješenja mogu se dobiti uvođenjem matematičkih aproksimacija, zahvaljujući čemu dobivamo pouzdane opise mnogih kemijskih fenomena. Rješavanje jednadžbe (2.22) s pripadnim hamiltonijanom bez korištenja eksperimentalnih podataka (osim fundamentalnih fizikalnih konstanti) naziva se *ab initio* pristupom.

3.2.1. Born-Oppenheimerova aproksimacija

Born-Oppenheimerova aproksimacija[98] je osnovna aproksimacija koja se koristi kako bi se pojednostavilo rješavanje Schrödingerove jednadžbe, što je moguće razdvajanjem gibanja jezgri od gibanja elektrona. Elektroni se kreću znatno brže od jezgri s obzirom na veliku razliku u masama, pri čemu su elektroni znatno lakši od jezgri. Jezgre se gibaju veoma sporo u odnosu na elektrone, međutim elektroni promptno reagiraju na promjene položaja jezgri. Jezgre možemo promatrati kao da su fiksne u odnosu na elektrone koji se gibaju u njihovom polju, što dozvoljava zanemarivanje T_n iz izraza (2.23) i (2.24), pri čemu je član V_{nn} koji se odnosi na promjenu potencijalne energije nastale uslijed odbijanja jezgri konstantan za dano uređenje

jezgri. Stoga, Born–Oppenheimerova aproksimacije omogućava konstruiranje elektronskog Hamiltonijana, $\widehat{H}_{\mathrm{el}}$

$$\widehat{H}_{\mathrm{el}} = -\sum_{a}^{\text{elektroni}} \frac{1}{2}\nabla_a^2 - \sum_{A}^{\text{jezgre}} \sum_{a}^{\text{elektroni}} \frac{Z_A}{r_{Aa}} + \sum_{a}^{\text{elektroni}} \sum_{b}^{\text{elektroni}} \frac{1}{r_{ab}} \qquad (2.25)$$

Rješavanjem Schrödingerove jednadžbe dobivaju se vlastite funkcije Ψ koje odgovaraju stacionarnim stanjima sustava, a svakom stanju pripada određena vlastita vrijednost elektronske energije, E_{el}. Nakon toga se dodaje V_{nn} (iz izraza 2.23, 2.24) kako bi se dobila ukupna energija E_{ukupna}. Na taj način se problem pojednostavljuje na izračunavanje dva člana, elektronske energije, E_{el} i energije međusobnog odbijanja jezgri, V_{nn}.

$$E_{ukupna} = E_{el} + V_{nn} \qquad (2.26)$$

3.2.2. Metoda Hartree-Fock

Valna funkcija višeelektronskog sustava može se izraziti kao determinanta čiji su elementi spinorbitale. Spinorbitala je produkt funkcije koja opisuje prostorne koordinate jednog elektrona i spinske funkcije tog elektrona. Kako bi se zadovoljio uvjet antisimetričnosti, valna funkcija višeelektronskog sustava se prikazuje se kao Slaterova determinanta čiji su elementi spinorbitale, χ.

$$\Psi(r) = \frac{1}{\sqrt{n!}} \begin{vmatrix} \chi_1(1) & \chi_2(1) & \cdots & \chi_n(1) \\ \chi_1(2) & \chi_2(2) & \cdots & \chi_n(2) \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ \chi_1(n) & \chi_2(n) & \cdots & \chi_n(n) \end{vmatrix} \qquad (2.27)$$

gdje je $\frac{1}{\sqrt{n!}}$ faktor normiranja koji osigurava da je vjerojatnost nalaženja elektrona u prostoru jednaka jedinici, a *n* je broj elektrona.

HF metoda primjenjuje varijacijski teorem prema kojem je energija osnovnog stanja uvijek viša od energije za egzaktnu valnu funkciju. Stoga, metoda Hartree-Fock uključuje metodu samousklađenog polja (engl. *self-consistent field,* SCF) za aproksimativno rješavanje Schrödingerove jednadžbe kako bi se za dani raspored jezgri pronašla elektronska valna

funkcija za koju će energija biti najniža. Metoda HF ne uzima u obzir da je gibanje elektrona međusobno korelirano, tj. da se oni u stvarnosti međusobno efikasnije izbjegavaju minimizirajući uzajamna odbijanja. Zbog toga je ukupna energija sustava izračunata metodom HF uvijek viša u odnosu na energiju sustava koja je izračunata metodom koja uzima u obzir korelaciju elektrona. U metode koje uzimaju u obzir korelirano gibanje elektrona (tzv. post-Hartree-Fock metode) spadaju metoda konfiguracijske interakcije (engl. *configurational interaction,* CI), metoda spregnutih grozdova (engl. *coupled cluster*, CC) i metoda koja se temelji na Møller-Plessetovoj perturbacijskoj teoriji.[99]

3.2.3. Metoda funkcionala gustoće (DFT)

Hohenberg i Kohn[100] su pokazali da je elektronska energija osnovnog stanja sustava u potpunosti određena elektronskom gustoćom, ρ_{el}, koja je funkcija samo tri prostorne koordinate.

$$E = E[\rho_{el}(x,y,z)] \tag{2.28}$$

Kao što je već rečeno, kod metode HF, za sustav koji se sastoji od *n* elektrona, ukupna valna funkcija sustava izračunava se na temelju *n* jednoelektronskih valnih funkcija, dok se DFT metodom opisuju svojstva molekule na temelju elektronske gustoće, ρ_{el} koja je u funkciji samo tri prostorne koordinate pri čemu se ne vodi računa o broju elektrona u danom sustavu, što znatno ubrzava račune. Kako je energija molekule funkcional elektronske gustoće, glavni cilj metode DFT je pronaći nepoznati funkcional koji će omogućiti određivanje energije iz elektronske gustoće. Prema Kohnu i Shamu elektronska energija sustava dana je izrazom 2.29.

$$E[\rho] = E^T[\rho] + E^V[\rho] + E^J[\rho] + E^{XC}[\rho] \tag{2.29}$$

Prva tri člana izraza 2.29 odnose se na klasičnu kinetičku energiju elektrona, elektrostatsko privlačenje elektrona i jezgara te klasično odbijanje između elektrona. Četvrti član odnosi se na energiju izmjene i korelacije (engl. *exchange-correlation*). E^{XC} se piše kao suma dijela koji se odnosi na izmjenu E^X i korelacijskog dijela E^C, pri čemu su oba člana funkcionali gustoće. Zbog toga su imena za većinu modela („funkcionala") sastavljena iz dva dijela. Osnovna aproksimacija je pretpostavka da se gustoća može promatrati kao uniformni elektronski plin.

Ovo se naziva „lokalna aproksimacija gustoće" (engl. *local density approximation*, LDA) i podrazumijeva to da je gustoća sporo varirajuća funkcija prostornih varijabli. Dodatno, ubačena je i spinska gustoća kao parametar (tj. ukupna gustoća izražava se kao zbroj alfa i beta gustoća), pa govorimo o LSDA (engl. *local spin density approximation*). Često korišten način za popravljanje LSDA funkcionala jest uvođenje gradijenta gustoće. Taj pristup naziva se poopćena gradijentna aproksimacija (engl. *generalized gradient approximation*, GGA), a nekada i „gradient corrected" (GC) metoda.[101] Becke je 1988. predložio korekciju gradijentom funkcionala izmjene, pa je taj funkcional E^X nazvan B88, ili jednostavno B. Ovaj funkcional izmjene široko se primjenjuje u kombinaciji s različitim GC funkcionalima korelacije E^C. Vrlo popularan funkcional korelacije razvili su Lee, Yang i Parr (LYP). Kombinacija Beckeovog funkcionala izmjene s funkcionalom korelacije kojeg su razvili Lee, Yang i Parr rezultirala je metodom koja se označava kao B-LYP. Budući da je u metodu HF uključena točna energija izmjene elektrona, Becke je formulirao funkcional koji se sastoji od smjese HF i DFT dijela koji se odnosi na izmjenu, te je tako napravio vrlo često korišten Beckeov model s tri parametra, B3.[102] To je hibridni tip funkcionala i a najpopularnija DFT metoda koja ga koristi je B3LYP model.

$$E_{\mathrm{B3LYP}}^{XC} = (1-a)E_S^X + a \cdot E_{HF}^X + b \cdot E_{\Delta B}^X + (1-c)E_{VWN}^C + c \cdot E_{LYP}^C \qquad (2.30)$$

U novije vrijeme (od 2005. nadalje), D. Truhlar je napravio seriju funkcionala koji se zajedničkim imenom zovu Minnesota funkcionali (M05, M06, M08, M11, M12). To su također hibridni funkcionali, koji su se pokazali veoma pouzdanim kod računanja termodinamičkih svojstava proučavanog sustava.

3.2.4. Skup osnovnih funkcija

U kvantno-mehaničkim računima osnovni skup je skup funkcija koje se koriste za opisivanje oblika orbitala u atomima. Kao osnovne funkcije u početku razvoja kvantno-mehaničkih računa korištene su Slaterove orbitale (engl. *Slater-type orbitals*, STO), zahvaljujući sličnosti s atomskim orbitalama vodika. Nedostatak funkcija Slaterovog tipa je to što su nepraktične za računanje dvoelektronskih integrala. Zbog toga se, umjesto njih, koriste orbitale Gaussovog tipa (GTO). Nedostatak GTO u odnosu na STO je što daju lošiji opis orbitala. Moguće je dobiti približan oblik Slaterove orbitale zbrajanjem nekoliko Gaussovih funkcija s različitim eksponentima i koeficijentima (kontrakcije). Osnovni skup se temelji na linearnoj kombinaciji Gaussovih funkcija kako bi se formirale orbitale. Standardni kvantno-mehanički programski paketi osiguravaju veći broj osnovnih skupova koji variraju u veličini i njihovom opisu elektrona u različitim atomskim orbitalama. Minimalni osnovni skup sadrži minimalni broj osnovnih funkcija neophodnih za opisivanje atoma. Primjer minimalnog osnovnog skupa je STO-3G, koji koristi tri funkcije Gaussovog tipa (3G) kako bi se aproksimirala jedna Slaterova orbitala. Postoji mnogo tipova skupova osnovnih funkcija, a u ovom radu korišteni su Popleovi osnovni skupovi. Sastavljeni su od segmentiranih kontrakcija i imaju oblik n-ijG ili n-ijkG. Unutarnje orbitale opisuju se jednom kontrakcijom n (jednostruki zeta), gdje n predstavlja broj primitivnih Gaussiana koji ulaze u kontrakciju, a orbitale valentne ljuske opisuju se dvjema ili trima kontrakcijama (dvostruki ij, odnosno trostruki ijk zeta). Ovim skupovima mogu se dodati i osnovne funkcije s višim angularnim momentom, radi što boljeg opisa polarizacije, i one se nazivaju polarizacijske funkcije. Tako se npr. osnovnom skupu 6-31G može dodati skup d funkcija za atome druge periode pa dobijemo 6-31G(d) (alternativna oznaka je 6-31G*), ili još i p funkcije za opis polarizacije H-atoma, što daje skup 6-31G(d,p). Moguće je dodavati i funkcije f-tipa, itd. Polarizacijskim funkcijama postiže se vjerniji opis perifernog dijela atomske orbitale. Nekada se osnovnom skupu dodaju i tzv. difuzne funkcije. Njihova uloga je da opišu dodatno raspršenje elektronskog naboja odnosno da omoguće reproduciranje elektronske gustoće na još većoj udaljenosti od jezgre (u odnosu na udaljenosti koje dozvoljavaju skupovi bez difuznih funkcija). To je potrebno kada sustav ima slobodne elektronske parove, ili kada se radi o anionima i slično. Difuzna funkcija označava se znakom +. Popleov osnovni skup koji ima jednu kontrakciju koja sadržava 6 primitivnih Gaussiana za opis unutrašnjih elektrona, zatim dvije kontrakcije s 3 odnosno 1 primitivnim Gaussianom, te još polarizacijsku funkciju za atome druge periode i difuznu funkciju, ima oznaku 6-31+G(d).

3.2.5. Izvođenje kvantno-mehaničkih računa

Kvantno-mehanički računi mogu se izvoditi u plinskoj fazi (tj. u vakuumu) ili u otapalu. Ako molekule otapala sudjeluju u kemijskoj reakciji s molekulama otopljene tvari, primjenjuje se tzv. eksplicitni opis otapala. Međutim, i kada nema direktnog sudjelovanja u reakciji, otapalo ipak može snažno utjecati na ponašanje otopljene tvari, djelujući kao medij koji utječe na strukturu i ostala svojstva reaktanata. Tada se utjecaj otapala opisuje uz pomoć tzv. implicitnih modela, koji su daleko ekonomičniji od eksplicitnog pristupa. Otapalo se promatra kao polarizabilni kontinuum (engl. *polarizable continuum model*, PCM) pri čemu se zanemaruju eksplicitne molekule otapala kako bi se pojednostavili računi. Također, postoje i tzv. hibridni pristupi, u kojima se eksplicitne molekule otapala koriste zajedno s polarizabilnim kontinuumom.

Kod implicitne solvatacije, sustav se opisuje tako da se molekula otopljene tvari promatra kao da je smještena u šupljinu (engl. *cavity*) okruženu polarizabilnim kontinuumom. Polarizacija otapala izražava se kao gustoća naboja na površini šupljine, pri čemu nastaje električno polje u šupljini koje djeluje na molekulu otopljene tvari. Osim polarizacije, u izraz za standardnu Gibbsovu energiju solvatacije ($\Delta_{solv}G^{o}$) ulaze i članovi koji nisu elektrostatski (Gibbsova energija kavitacije i disperzije). Elektrostatski dio može se izračunati uz pomoć Poissonove jednadžbe, koja povezuje elektrostatski potencijal, gustoću naboja i dielektričnu konstantu za promatrano otapalo. Najstariji model koji koristi polarizabilni kontinuum za implicitni opis otapala je dielektrični PCM, D-PCM (engl. *dielectric PCM*). Šupljine se konstruiraju preklapanjem sfera koje su centrirane na atomima molekule otopljene tvari, pri čemu se kao radijus sfera uzima Van der Waalsov radijus atoma uz empirijsku korekciju. Površina tako formirane šupljine dijeli se na fragmente kojima se pridružuju točkasti naboji, čije vrijednosti se zatim variraju metodom SCF, dok se ne dođe do konvergencije. Danas, najviše korišteni implicitni model solvatacije zasnovan na polarizabilnom kontinuumu je IEF-PCM (engl. *integral equation formalism*), koji je efikasniji od D-PCM jer zaobilazi rješavanje Poissonove jednadžbe. Elektrostatski potencijal se redefinira preko Greenovih funkcija.[103] Na pristupu IEF-PCM zasniva se i Truhlarova metoda SMD (engl. *solvation model based on density*),[104] koja uvodi veliki broj dodatnih empirijskih parametara, s ciljem da se osigura veća pouzdanost metode. Od modela implicitnog otapala, treba spomenuti i COSMO (engl. *conductor like screening model*) u kojem se molekule otopljene tvari smještaju u vodljivi medij

umjesto u dielektrik, pa je potencijal izvan šupljine jednak nuli, a naboj otapala se raspoređuje po površini šupljine i generiran je nabojem molekule otopljene tvari.[105] Pri izradi ove disertacije korišten je C-PCM (engl. *conductor PCM*)[106] što je PCM verzija COSMO pristupa.

Glavni cilj kvantno-mehaničkih računa je određivanje svojstava molekula poput geometrije i ukupne energije sustava, računanje barijera kemijskih reakcija, energija ionizacije, bazičnosti i sl. Međutim, iako su kvantno-mehanički računi neizostavni alat u modernim znanstvenim istraživanjima, računi ovog tipa su iznimno računalno zahtjevni te su općenito limitirani na male molekule ili sustave do najviše 300 atoma. U slučaju kada želimo proučavati biološke makromolekule u kondenziranoj fazi (kao što je vodena otopina), za opisivanje biomakromolekula mogu se koristiti pristupi poput metode QM-klaster, metoda EVB ili metoda QM/MM, od kojih posljednje dvije uzimaju u obzir čitavu strukturu enzima te eksplicitne molekule otapala. U izradi ove disertacije za proučavanje mehanizma enzimski kataliziranih reakcija korištene su metode QM-klaster metoda i EVB.

3.2.6. Metoda QM-klaster

Kod metode QM-klaster određeni broj atoma enzima koji su direktno uključeni u kemijsku reakciju (najviše do 300 atoma) izdvaja se iz strukture kako bi se tretirali na QM razini u plinskoj fazi ili u otapalu koje je modelirano dielektričnim kontinuumom.[107] Ukoliko su molekule vode direktno uključene u reakciju, one se prikazuju eksplicitno. U drugom pristupu, sličnom QM-klaster metodi, aktivno mjesto enzima se i dalje tretira QM metodama dok se ostatak proteina te otapalo umjesto dielektričnim kontinuumom modeliraju molekulsko-mehaničkim metodama te govorimo o QM/MM pristupu.[108,109] Ovakav način osigurava preciznije opisivanje utjecaja ostatka enzima na reakciju, ali ovaj pristup je računalno zahtjevniji u odnosu na metodu QM-klaster. S druge strane, pokazano je da su rezultati dobiveni QM/MM računima neovisni o veličini QM regije (dijela proučavanog sustava koji se tretira kvantno-mehaničkim metodama) pod uvjetom da su QM regijom obuhvaćene aminokiseline koje sudjeluju u proučavanoj reakciji.[110,111] Stoga, pravi odabir QM regije koja će adekvatno predstavljati model enzimske reakcije te odabir dielektrične konstante koja će predstavljati ostatak enzima i efekte otapala su najosjetljiviji dio QM-klaster pristupa.[112,113] Međutim, pokazano je da kada QM regija uključuje 150-200 atoma, rezultati dobiveni QM-klaster pristupom postaju neovisni o dielektričnoj konstanti.[114] Metoda QM-klaster koristi se često pri inicijalnom ispitivanju mogućih mehanizama, odnosno ispitivanju validnosti mehanizama predloženih u literaturi. Metoda QM-klaster pokazala se vrlo uspješnom u proučavanju energetike enzimskih reakcija te razlučivanju katalitičkog mehanizma niza enzima.[115-117] U izradi ove doktorske disertacije metoda QM-klaster korištena je u ispitivanju predloženog hidridnog mehanizma za enzim MAO B te ispitivanju predloženog i definiranju najizglednijeg mehanizma za enzim DAO.

Kako bismo izračunali brzinu kojom se reaktanti prevode u produkte neophodno je istražiti plohu potencijalne energije za dani sustav, odnosno definirati kako se promatrani sustav mijenja prolazeći od jednog minimuma k drugom na plohi potencijalne energije. Bitno je ispitati koje se promjene u gemetriji događaju te ispitati promjenu energije sustava s danim geometrijskim promjenama. Svaka točka na plohi potencijalne enregije predstavlja jedinstvenu strukturu promatranog sustava (molekule). Međutim, nisu sve točke na plohi potencijalne energije podjednako zanimljive. Od interesa su točke minimuma koje mogu biti reaktanti, međuprodukti ili produkti promatrane kemijske reakcije te sedlaste točke koje odgovaraju sturkturama prijelaznog stanja. Put koji spaja točke minimuma naziva se put najniže energije (engl. *minimum-energy path*, MEP). Kako se sustav pomiče od jednog minimuma k drugom,

energija sustava raste do točke prijelazne strukture nakon čega energija sustava pada. U točkama minimuma, sve komponente gradijenta energije iznose nula, dok sve vlastite vrijednosti matrice drugih derivacija imaju pozitivnu vrijednost. U sedlastoj točki (prijelazna struktura) prve derivacije energije po koordinatama također imaju vrijednost nula. Međutim, broj negativnih vrijednosti Hesseove matrice koristi se za razlikovanje prijelaznih struktura. Od interesa su sedlaste točke prvog reda, odnosno stacionarna točka u kojoj je jedna vlastita vrijednost matrice drugih derivacija energije negativna. Ovoj negativnoj vrijednosti pripada imaginarna frekvencija. Metodom geometrijske optimizacije mogu se locirati stacionarne točke na plohi potencijalne energije, međutim ne može se utvrditi njezina priroda. Za geometrijsku optimizaciju prijelazne strukture potrebno je upotrijebiti početnu strukturu sustava koja je što sličnija prijelaznoj strukturi. Kako bismo nedvojbeno okarakterizirali stacionarnu točku, odnosno utvrdili radi li se o točki minimuma ili sedlastoj točki, neophodno je provesti frekvencijski račun. Kada se dobije prijelazna struktura s jednom imaginarnom frekvencijom potrebno je analizirati normalni mod koji odgovara danoj imaginarnoj frekvenciji te primijeniti metodu intrinzičke reakcijske koordinate (engl. *intrinsic reaction coordinate*, IRC) kako bi se izračunalo koje minimume spaja dana sedlasta točka na plohi potencijalne energije. Ulazna struktura za račun IRC je struktura prijelaznog stanja čija se geometrija postupno optimira u jednom smjeru (smjer reaktanata), odnosno u drugom smjeru (smjer produkata). Geometrije dobivenih struktura se ponovno trebaju optimirati kako bi dobili lokalne minimume koji odgovaraju reaktantima i produktima povezanim tom konkretnom prijelaznom strukturom. Na taj način se definira put kojim se dana kemijska reakcija odvija. Prijelazna struktura je točka najviše energije duž ovog puta, a relativna energija izračunata u odnosu na energiju reaktanta određuje brzinu reakcije dobivenu na temelju teorije prijelaznog stanja, odnosno primjenom Eyringove jednadžbe (2.31). Ukoliko pretpostavimo da su molekule u prijelaznom stanju u ravnoteži s reaktantima, konstanta brzine reakcije, *k*, se izražava:

$$k = \frac{k_B T}{h} \exp\left(-\frac{\Delta^{\ddagger} G^{o}}{k_B T}\right) \tag{2.31}$$

gdje je $\Delta^{\ddagger}G^{o}$

$$\Delta^{\ddagger}G^{o} = \Delta G_{(TS)} - \Delta G_{(reaktanti)} \tag{2.32}$$

$\Delta^{\ddagger}G^{o}$ je razlika standardne Gibbsove energije između prijelaznog stanja, TS i reaktanta, dok je k_B Boltzmannova konstanta. Teorija prijelaznog stanja vrijedi u uvjetima kada sve molekule u stanju reaktanata prijeđu preko prijelaznog stanja kako bi došli u stanje produkta, dok je povratna reakcija prelaska produkata u prijelazno stanje zanemarena. Zato će izračunata konstanta brzine iz jednadžbe (2.31) uvijek biti gornja vrijednost za konstantu brzine. Standardna Gibbsova energija reakcije, $\Delta_r G^{o}$, je razlika standardne Gibbsove energije između produkta i reaktanta,

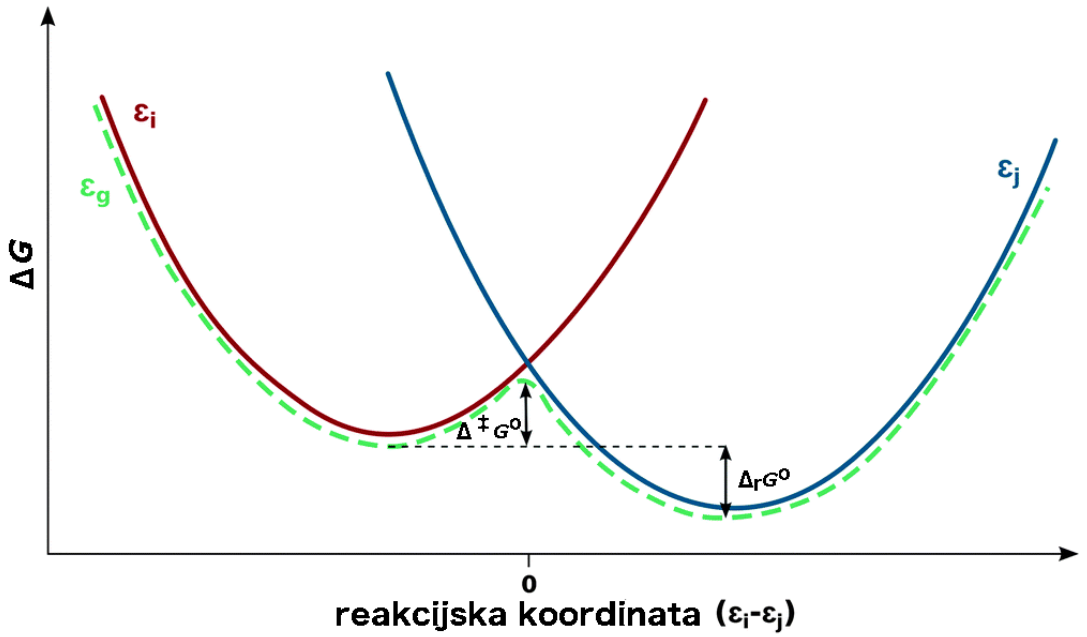
$$\Delta_r G^{o} = \Delta G_{(\text{produkti})} - \Delta G_{(\text{reaktanti})} \tag{2.33}$$

dok se konstanta ravnoteže za danu reakciju može izračunati iz sljedeće jednadžbe (2.34).

$$K_{\text{eq}} = e^{\frac{-\Delta_r G^{o}}{RT}} \tag{2.34}$$

3.3. EVB metoda

Kvantno-mehanički računi na modelu enzima u okviru klaster pristupa korisna je metoda za ispitivanje mehanizma enzimski kataliziranih reakcija s obzirom na jednostavnost i brzinu izvedbe takvih računa. Međutim, kako bismo opisali dugodosežne elektrostatske interakcije neophodno je uzeti u obzir čitavu strukturu enzima od interesa. U tom slučaju na raspolaganju su hibridne metode QM/MM ili EVB. Kod hibridne metode QM/MM, aktivno mjesto enzima tj. dio enzima u okviru kog se odvija kemijska reakcija se tretira metodama QM (*ab initio* ili DFT), dok se ostatak enzima opisuje poljem sila, odnosno metodama MM. Međutim, metoda QM/MM još uvijek je zahtjevna u pogledu računalne snage. Često nije moguće izvesti opsežnu konformacijsku pretragu koja je potrebna kako bi Gibbsova energija konvergirala te nije rijetkost dobiti neusporedive rezultate za različite početne konformacije istog sustava.[118] S druge strane metoda EVB[119] dovoljno je brza da omogući opsežnu konformacijsku pretragu neophodnu za dobivanje konvergiranih rezultata, dok istodobno omogućava adekvatan opis kovalentne veze kako bi se mogla simulirati kemijska reakcija. EVB se može objasniti na primjeru jednostavne kemijske reakcije, A → B. Molekule uključene u reakciju, reaktanti i produkti, su opisani kao centri parabola koje odgovaraju različitim diabatskim stanjima nultog reda koja su opisana klasičnim strukturama, reaktantom odnosno produktom duž odabrane reakcijske koordinate (Slika 17). Metoda EVB koristi pristup FEP/US (engl. *free energy perturbation/umbrella sampling*) s tim što se kovalentne veze koje se cijepaju odnosno nastaju opisuju Morseovim potencijalom. Kemijska reakcija je opisana potencijalom povezivanja (engl. *mapping potential*) koji predstavlja linearnu kombinaciju ovih dijabatskih stanja, koristeći empirijske parametre kako bi se opisalo spajanje (engl. *coupling*) ovih parabola. Metoda EVB se oslanja na kalibraciju empirijskih parametara kako bi se opisala energetika referentne reakcije koja može biti reakcija u vakuumu ili vodenoj otopini u slučaju kada želimo proučavati katalitički efekt prouzročen enzimom. Referentna reakcija također može biti i reakcija katalizirana enzimom divljeg tipa ukoliko smo zainteresirani za katalitički efekt mutanta enzima. Kada se kalibriraju, parametri se koriste neizmjenjeni za opisivanje iste reakcije, ali u drugom okruženju okruženju. Parametri opisuju spajanje (kombiniranje) parabola prikazanih na Slici 17.



Slika 17. Shematski prikaz metode EVB, gdje su ε_i i ε_j energije dva dijabatska stanja, $\Delta^{\ddagger}G^{o}$ je standardna Gibbsova energija aktivacije za danu reakciju, $\Delta_r G^{o}$ je standardna Gibbsova energija reakcije. Reakcijska koordinata je predstavljena razlikom energije dva dijabatska stanja ($\varepsilon_i - \varepsilon_j$). Preuzeto i prerađeno iz [120].

Potencijalna energija svakog od ovih diabatskih stanja predstavljena je klasičnim poljem sila u sljedećoj formi:

$$H_{ii} = \varepsilon_i = \alpha_{plin}^{i} + U_{intra}^{i}(R,Q) + U_{So}^{i}(R,Q,r,q) + U_{oo}(r,q) \qquad (2.34)$$

Ovdje, R i Q predstavljaju koordinate i naboje dijabatskih stanja, dok se r i q odnose na kooridnate i naboje atoma okruženja koje može biti otapalo ili protein. $U_{intra}^{i}(r,q)$ predstavlja intramolekulski potencijal sustava i interakcije između soluta (S) i otapala (o). $U_{oo}(r,q)$ označava interakcije okruženje-okruženje (oo), između površinskih atoma proteina i otapala koje ga okružuje. α_{plin}^{i} predstavlja energiju u plinskoj fazi i dijabatskog stanja. ε_i formira dijagonalni element EVB Hamiltonijana (Hii) za odgovarajuće stanje:

$$\hat{H}^{EVB} = \begin{pmatrix} H_{ii} & H_{ij} \\ H_{ij} & H_{jj} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \varepsilon_i & H_{ij} \\ H_{ij} & \varepsilon_j \end{pmatrix} \qquad (2.35)$$

i i *j* označavaju stanje reaktanata i produkta za slučaj prikazan na Slici 17. Odgovarajući vandijagonalni dio matrice, H_{ij} može se dobiti na sljedeći način:

$$H_{ij} = \sqrt{(\varepsilon_i - E_g)(\varepsilon_j - E_g)} \tag{2.36}$$

Glavna aproksimacija metode EVB odnosni se upravo na H_{ij} koji je isti u plinskoj fazi, vodenoj otopini i proteinu. Kada se dijagonalni i vandijagonalni elementi matrice definiraju, standardna Gibbsova energija aktivacije dobiva se povezivanjem jednog dijabatskog stanja s drugim. Ovo se može postići linearnom kombinacijom potencijala oba dijabatska stanja:

$$\varepsilon_m = (1 - \lambda_m)\varepsilon_i + \lambda_m \varepsilon_j \tag{2.37}$$

gdje ε_m označava odgovarajući potencijal povezivanja (engl. *mapping potential*). ε_i *i* ε_j predstavlja potencijale dva dijabatska stanja *i* i *j*, λ_m faktor koji se mijenja od stanja 0 (reaktanti) do stanja 1 (produkti) u definiranim inkrementima *n* + 1, i koji prevodi sustav duž reakcijske koordinate od reaktanta do produkta. Odgovarajuća Gibbsova energija povezana s promjenom λ_m od 0 do *m/n* (ΔG_m) se izračunava koristeći metodu perturbacije slobodne energije (engl. *free-energy perturbation*, FEP).

3.4. Programi

Za vizualizaciju molekula i analizu trajektorija korišteni su programi VMD[121] (engl. *visual molecular dynamics*), Chimera[122] PyMOL[123] i Molden.[124] Svi kvantno-mehanički računi napravljeni su upotrebom programa Gaussian09,[125] molekulsko-dinamičke simulacije napravljene su pomoću programskog paketa AMBER14,[96] dok su EVB simulacije napravljene korištenjem programskog paketa Q.[126]

Program CPPTRAJ koji je dostupan unutar paketa AMBERTools15,[96] koristio se za analizu i procesiranje trajektorija dobivenih u molekulsko-dinamičkim simulacijama poput praćenja određenih geometrijskih parametara kao što su vrijednosti RMSD, udaljenosti između pojedinih atoma u sustavu te za kreiranje reprezentativnih struktura.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Histaminski receptor H_2

Histamin je iznimno važna signalna molekula koja djeluje kroz ostvarivanje interakcija s jednim od četiri histaminska receptora, H_1, H_2, H_3 i H_4. Za sada postoji riješena struktura samo jednog histaminskog receptora, H_1, koja je na atomskoj razini dala uvid u vezno mjesto antagonista doksepina.[16] Iako preostalim receptorima još uvijek nije riješena struktura zna se da strukturno pripadaju receptorima koji su povezani s G proteinima.

Aktivacija histaminskog receptora H_2 (H_2R) agonistom histaminom stimulira izlučivanje želučane kiseline. Prema svojoj strukturi, agonisti receptora H_2 dijele se u dvije skupine: agonisti aminskog tipa i agonisti gvanidinskog tipa. Poremećaji u funkcioniranju H_2R povezani su s bolestima probavnog sustava poput peptičkog ulkusa i gastritisa. Zbog toga je H_2R atraktivna meta za razvoj novih lijekova, odnosno blokatori (antagonisti) receptora H_2 se koriste u liječenju ulkusa i gastritisa. Za sada su u kliničkoj upotrebi dva antagonista receptora H_2R, cimetidin i ranitidin, čijom se upotrebom postiže smanjeno lučenje želučane kiseline. Kako trodimenzionalna struktura receptora H_2 još nije riješena, priprava novih antagonista je usporena. Stoga bi poznavanje strukture receptora omogućilo razumijevanje mehanizma aktivacije receptora agonistima te osiguralo temelj za racionalni dizajn novih antagonista.

U ovom dijelu doktorske disertacije prikazani su rezultati koji se odnose na homologno modeliranje histaminskog receptora H_2 te molekulsko-dinamičke simulacije modela receptora H_2 u kompleksu s agonistom histaminom kako bi se utvrdile interakcije u veznom mjestu receptora za koje se pretpostavlja da su važne za njegovu aktivaciju.

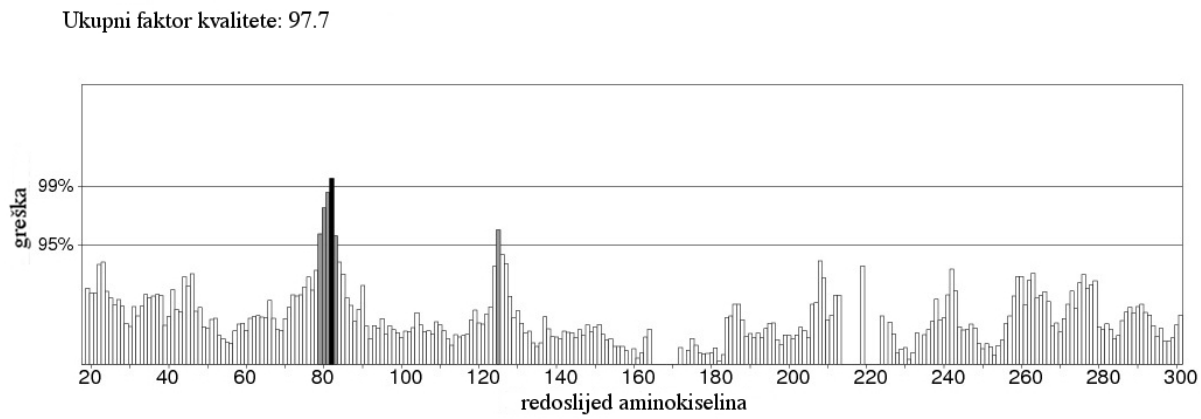
4.1.1. Modeliranje histaminskog receptora H_2

Primarna struktura histaminskog receptora H_2 preuzeta je iz baze podataka UniProt (engl. *universal protein resource,* UniProt). U sljedećem koraku, u postupku sravnjenja primarnih struktura, pronađeni su proteini čija je trodimenzionalna struktura eksperimentalno riješena, a čija je primarna struktura što sličnija aminokiselinskom slijedu humanog histaminskog receptora H_2. Ovaj korak napravljen je korištenjem algoritma BLAST (engl. *basic local alignment search tool,* BLAST) i rezultirao je nizom trodimenzionalnih proteinskih struktura koje su poredane prema postotku identičnosti u primarnoj strukturi (engl. *sequence identity percentage*) i E vrijednosti (engl. *expected value*). Provjerena je kvaliteta dobivenih struktura te su odabrane one koje imaju najbolju rezoluciju, vodeći računa o tome da se odaberu one strukture koje imaju najveću sličnost primarne strukture sa strukturom histaminskog receptora H_2 (Tablica 3). Odabrane su sljedeće strukture: humani histaminski receptor H_1 (PDB kod 3RZE), neurokininski 1-receptor (PDB kod 2KS9), humani β2-adrenergički receptor (PDB kod 2RH1), humani β1-adrenergički receptor (PDB kod 4BVN) i muskarinski acetilkolinski receptor M3 (PDB kod 4DAJ).

Tablica 3. Karakteristike odabranih proteina u odnosu na primarnu strukturu humanog histaminskog receptora H_2 (UniProt ID P25021).

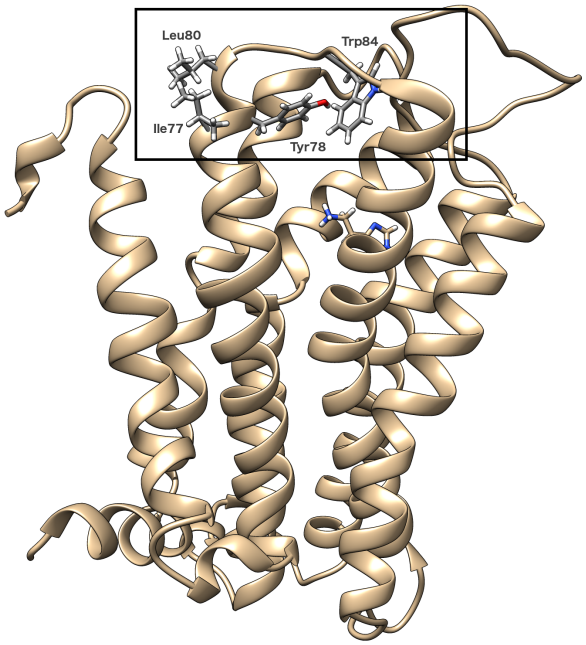
PDB kod	Postotak identičnosti	Postotak (+) izmjena	E vrijednost	Postotak poravnanja	Eksperimentalna metoda	Rezolucija
3RZE	34 %	57 %	e^{-33}	80 %	dif. rendgenskih zraka	3,1 Å
2KS9	24 %	46 %	e^{-26}	84 %	NMR u otopini	
2RH1	36 %	59 %	e^{-42}	84 %	dif. rendgenskih zraka	2,4 Å
4BVN	38 %	59 %	e^{-67}	78 %	dif. rendgenskih zraka	2,1 Å
4DAJ	32 %	55 %	e^{-29}	80 %	dif. rendgenskih zraka	3,4 Å

Modeli strukture humanog histaminskog receptora H_2 napravljeni su pomoću dostupnih programa za modeliranje: I-TASSER,[127] MODELLER,[128] SWISS-MODEL[129] i Phyre2.[130] Kvaliteta izgrađenih modela provjerena je procjenjivanjem neveznih interakcija između atoma aminokiselina modeliranog receptora u programu ERRAT[131] (Slika 18) koji se inače koristi za provjeru kvalitete struktura dobivenih difrakcijom rendgenskih zraka na kristalima.



Slika 18. Provjera kvalitete napravljenog modela histaminskog receptora H_2 u programu ERRAT. Prikazan je rezultat za najkvalitetniji model s faktorom kvalitete 97.7 %.

Na ordinati (os y) prikazana je vrijednost greške tj. prikazana je pouzdanost s kojom možemo tvrditi da postoje neželjeni kontakti u dijelu strukture koje prelaze vrijednost označenog praga. Kvalitetne strukture obično imaju ukupni faktor kvalitete (engl. *overall quality factor*) ≥ 95 %. Nepovoljni kontakti potječu od aminokiselina koje se nalaze oko osamdesete aminokiseline u primarnoj strukturi. Konkretno, uočeni su nepovoljni kontakti između Ile77 i Leu80 te Tyr78 i Trp84 (Slika 19).



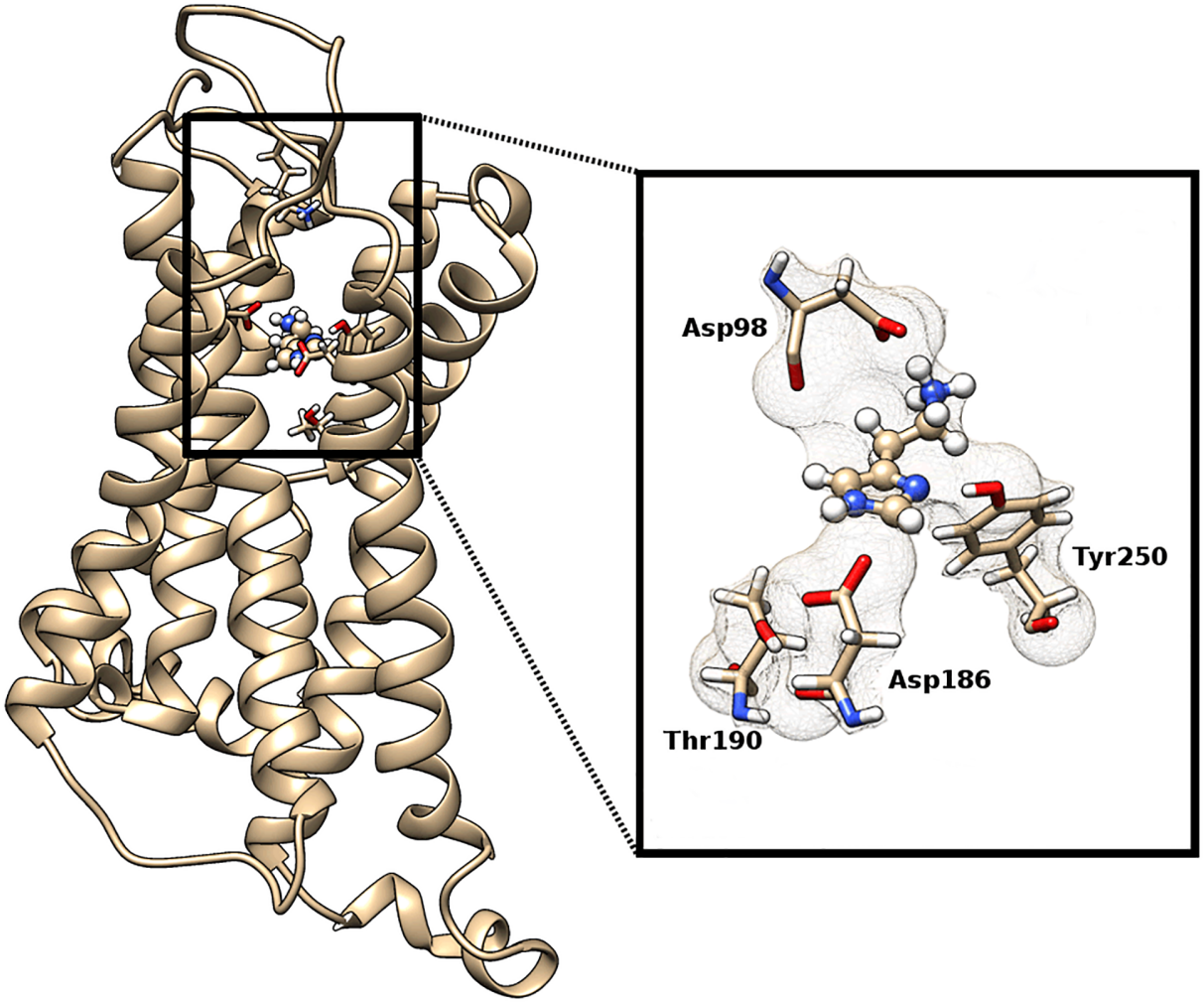
Slika 19. Napravljeni model histaminskog receptora H_2 koji je uzet kao početna struktura za MD simulacije.

Odabrani model receptora, čija struktura se koristila u istraživanju, napravljen je pomoću servera SWISS-MODEL. U sljedećem koraku agonist histamin smješten je u vezno mjesto modeliranog receptora vodeći računa o ranije opisanom načinu vezanja u literaturi. Iz ranije provedenih eksperimentalnih istraživanja utvrđeno je da su tri aminokiseline receptora H_2 važne za vezanje histamina, Asp98, Asp186 i Thr190[132,133] što je u potpunom slaganju s Weinsteinovim mehanističkim modelom[134] kojeg je koristio za kvantno-mehaničke račune još davne 1976. godine. Također, pokazano je da se histamin veže u vezno mjesto receptora kao monokation te je kao takav i modeliran.[135-137] Napravljeno je ukupno pet početnih struktura kompleksa receptora H_2 i histamina u kojima je pozicija histamina svaki put drugačije zarotirana. Na ovaj način htjelo se proučiti vezanje histamina u veznom mjestu receptora H_2 tako da ono bude što manje ovisno o inicijalnom postavljanju histamina.

Za parametrizaciju izgrađenih kompleksa korištena su polja sila GAFF[83] i ff14SB.[138] U svrhu određivanja parametara te parcijalnih atomskih naboja na agonistu histaminu provedeni su kvantno-mehanički računi, koristeći programski paket Gaussian09[125] uz primjenu razine teorije HF/6-31G(d). Početno protonacijsko stanje aminokiselina receptora određeno je pomoću servera PROPKA 3.1[139] i vizualnom provjerom susjedstva onih aminokiselina koje mogu imati različita protonacijska stanja poput histamina. Svi arginini i lizini su pozitivno (+1), a glutamati i aspartati negativno (−1) nabijeni, kao što se i očekuje pri fiziološkom pH. Dobiveni kompleksi smješteni su u centar krnjeg oktaedra ispunjenog molekulama vode TIP3P,[85] pri čemu je voda dosezala do udaljenosti od 10 Å od površine kompleksa. Za neutraliziranje sustava dodano je 12 aniona Cl^-. Optimizacija geometrije kompleksa i molekulsko-dinamičke simulacije provedene su unutar programa AMBER14.[96] Korišteni su periodični rubni uvjeti, a elektrostatske interakcije računate su metodom PME. Kompleksi su prvo optimizirani koristeći metode najstrmijeg spusta i konjugiranih gradijenata. Nakon optimiranja svaki sustav je zagrijavan, pri čemu je temperatura linearno povećana od 0 K do 300 K u uvjetima NVT u periodu od 50 ps. Nakon uravnoteženja kompleksi su simulirani 100 ns korištenjem uvjeta NPT pri temperaturi od 300 K i tlaku od 1 atm, korištenjem Langevinovog termostata s frekvencijom sudara 1 ps^{-1}. Algoritam SHAKE[94] korišten je za ograničenje vibracija veza u kojima sudjeluju atomi vodika.

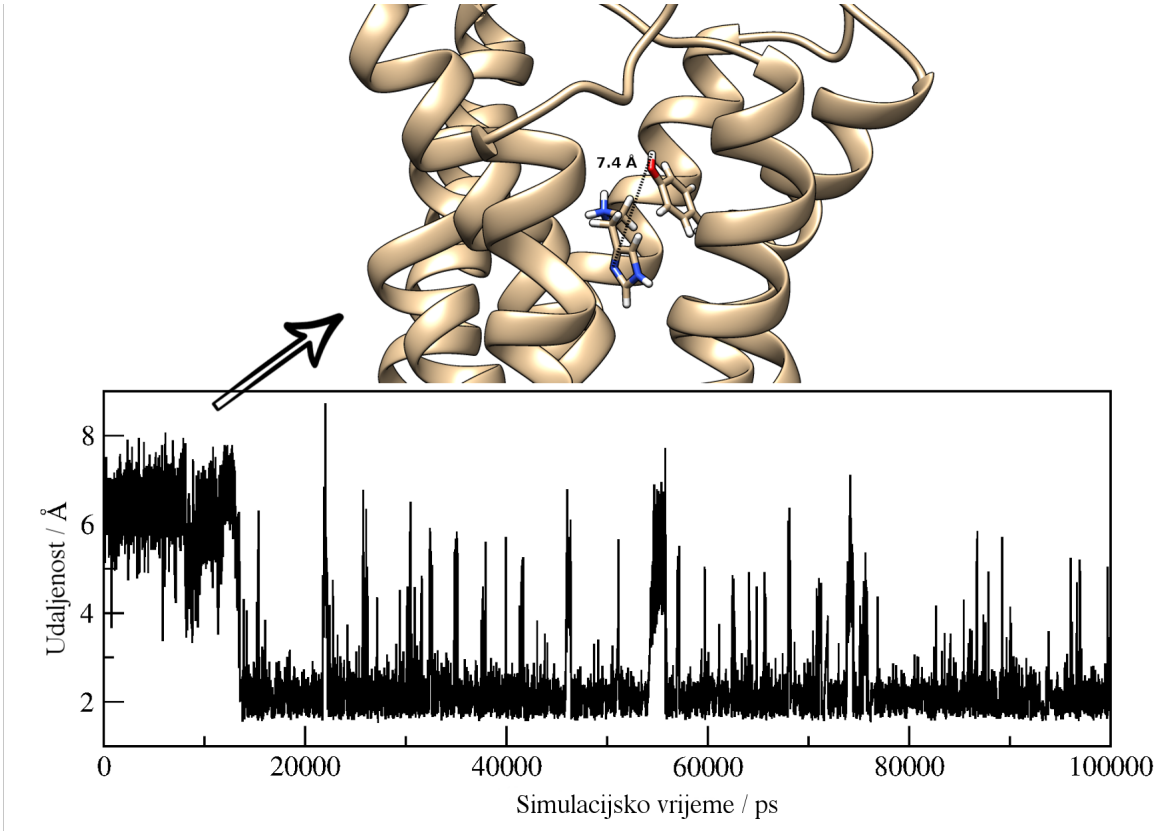
Sve molekulsko-dinamičke simulacije su rezultirale gotovo jednako zastupljenom orijentacijom histamina u veznom mjestu receptora. Analizom molekulsko-dinamičkih simulacija identificirane su tri aminokiseline koje su bitne za vezanje histamina, a to su Asp98, Asp186 i Tyr250. Primjećeno je kako karboksilat iz bočnog ogranka Asp98 interagira s

pozitivno nabijenom amino skupinom etilamino dijela histamina, Asp186 interagira s N-H vodikom iz imidazolnog prstena histamina, dok Tyr250 ostvaruje vodikovu vezu s drugim dušikom imidazolnog prstena (Slika 20).



Slika 20. Struktura histaminskog receptora H_2 u kompleksu s histaminom. U desnom dijelu slike označene se najvažnije interakcije između histamina i aminokiselina veznog mjesta receptora H_2.

Sve simulacije rezultirale su orijentacijom histamina koja podrazumijeva stvaranje vodikove veze između hidroksilne skupine iz bočnog ogranka Tyr250 i imino dušika na histaminu.[140] Na Slici 21. prikazana je struktura kompleksa u kojem je početna udaljenost između Tyr250 i imino dušika histamina bila najveća od svih pet modeliranih kompleksa i iznosila je 7,4 Å. Praćenjem udaljenosti između atoma vodika hidroksilne skupine iz bočnog ogranka Tyr250 i imino dušika histamina vidi se kako se već nakon 15 ns histamin orijentirao u veznom mjestu tako da ostvaruje vodikovu vezu s Tyr250.



Slika 21. Praćenje udaljenosti između atoma vodika iz hidroksilne skupine Tyr250 i imino dušika agonista histamina. Nakon 15 ns MD simulacija histamin se orijentira tako da ostvaruje vodikovu vezu sa OH skupinom Tyr250 i tako ostaje orijentiran do kraja simulacija.

Ovdje je bitno naglasiti da se radi o novom načinu vezanja histamina, odnosno o novim identificiranim interakcijama koje se ostvaruju u okviru veznog mjesta receptora H_2. Naime, istraživanje u kom je Thr190 receptora H_2 zamijenjen alaninom,[132] rezultiralo je značajnim smanjenjem efikasnosti histamina kao agonista. Ovo je vodilo zaključku kako Thr190 svojom OH skupinom iz bočnog ogranka formira vodikovu vezu s imino dušikom na imidazolnom prstenu histamina te na taj način direktno sudjeluje u pravilnom vezanju histamina u veznom mjestu receptora. Međutim, iz provedenih molekulsko-dinamičkih simulacija vidi se da Thr190 ne može ostvariti vodikovu vezu s imino dušikom na histaminu (Slika 20), već navedena hidroksilna skupina treonina ostvaruje vodikovu vezu s karbonilom iz okosnice Asp186. S druge strane, svih pet MD simulacija pokazalo je da Tyr250 svojom hidroksilnom skupinom iz bočnog ogranka ostvaruje vodikovu vezu s imino dušikom iz histamina što je nova identificirana interakcija između aminokiselina veznog mjesta receptora H_2 i histamina. Važnost Tyr250 u vezanju agonista potvrdilo je i računalno istraživanje provedeno na histaminskom receptoru H_2 koji je izgrađen na temelju β1-adrenergičkog receptora (PDB kod

2VT4) u kompleksu s nizom predloženih agonista gvanidinskog tipa, a koja je pokazala kako je Tyr250 važan za vezanje proučavanih agonista gvanidinskog tipa.[141]

Modelirana struktura receptora dalje je poslužila za ispitivanje efekta deuteriranja histamina na vezanje za receptor $H_{2,}$[140] gdje je računalno i eksperimentalno potvrđeno da deuterirani histamin ima veći afinitet za receptor H_2 u odnosu na nedeuterirani histamin. Motivacija za proučavanje efekta deuteracije histamina na vezanje za receptor leži u činjenici da deuterirane verzije lijekova uglavnom pokazuju poboljšana farmakokinetička svojstva zbog jače (kraće) veze X-D (X=C, N) što rezultira izmijenjenim metabolizmom danog lijeka. Stoga, zamjena vodika deuterijem u lijekovima može rezultirati poboljšanim karakteristikama danog lijeka tijekom metabolizma. Uvođenje deuterija može rezultirati sporijom razgradnjom takvog lijeka što dovodi do upotrebe manjih doza. Također, deuterirani lijek i njegovi metaboliti mogu biti manje toksični od nedeuterirane verzije istog lijeka. Pokazano je da deuterirani fluoroalanin ima poboljšana farmakokinetička svojstva u antimikrobnoj terapiji,[142] dok je za deuterirani anestetik halotan pokazano kako je manje toksičan za jetru.[143]

4.2. Monoamin-oksidaza B

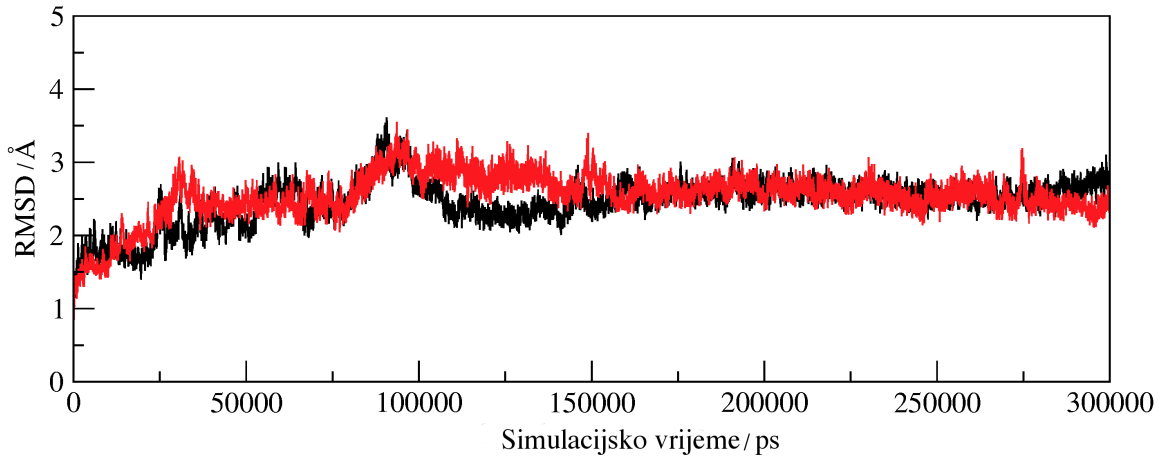
Nakon što obavi svoju fiziološku ulogu višak histamina u tijelu se uklanja u sklopu jednog od dva katabolička puta. Jedan od njih započinje enzimskim metiliranjem histamina uslijed čega nastaje *N*-metilhistamin koji se dalje metabolizira enzimom MAO B. Pored razgradnje histamina, MAO B sudjeluje i u katabolizmu drugih važnih biogenih amina od kojih su najznačajniji dopamin i noradrenalin. Iako postoji veliki broj istraživanja koja se bave proučavanjem katalitičkog mehanizma ovog enzima, manje je pažnje posvećeno selektivnosti odnosno prepoznavanju odgovarajućeg supstrata. Kao što se može vidjeti u Tablici 1, *N*-metilhistamin je fiziološki supstrat enzima MAO B, odnosno puno je bolji supstrat od histamina, iako se ova dva spoja razlikuju u samo jednoj metilnoj skupini koja je vezana za dušik imidazolnog prstena u nereaktivnom dijelu molekule.

U ovom dijelu disertacije prikazani su rezultati koji se odnose na ispitivanje katalitičkog mehanizma te selektivnosti enzima MAO B na primjeru *N*-metilhistamina i histamina. Metodom molekulske dinamike uz primjenu metode MM-PBSA za izračun Gibbsove energije vezanja oba supstrata opisane su determinante specifičnosti ovog enzima. Zatim su pripremljene početne strukture za kvantno-mehaničke račune u okviru klaster pristupa te za simulacije EVB kojima je opisan katalitički mehanizam i supstratna specifičnost ovog enzima.

4.2.1. Molekulsko-dinamičke simulacije enzima MAO B

Struktura enzima MAO B u kompleksu s 2-(2-benzofuranil)-2-imidazolinom (PDB kod 2XFN) rezolucije 1,6 Å[144] preuzeta je iz baze podataka PDB. Aminokiseline koje nedostaju u strukturi izgrađene su korištenjem servera I-TASSER.[127] Izgrađena su dva MAO B kompleksa, jedan kompleks s vezanim *N*-metilhistaminom, a drugi s vezanim histaminom u aktivnom mjestu enzima. Oba supstrata su modelirana kao monokationi, što je u suglasnosti s eksperimentalnim [145,146] i računalnim istraživanjima.[147] Za parametrizaciju izgrađenih kompleksa korišteni su polja sila GAFF[83] i ff14SB.[138] U svrhu određivanja parametara te parcijalnih atomskih naboja na oba supstrata, histaminu i *N*-metilhistaminu te kofaktoru FAD provedeni su kvantno-mehanički računi, koristeći programski paket Gaussian09[125] uz primjenu razine teorije HF/6-31G(d). Početno protonacijsko stanje aminokiselina enzima MAO B određeno je pomoću servera PROPKA 3.1[139] i vizualnom provjerom susjedstva onih aminokiselina koje mogu imati različita protonacijska stanja. Svi arginini i lizini su pozitivno (+1), a glutamati i aspartati negativno (−1) nabijeni, kao što se i očekuje pri fiziološkom pH. Oba kompleksa smještena su u centar krnjeg oktaedra ispunjenog molekulama vode TIP3P,[85] pri čemu je voda dosezala do udaljenosti od 10 Å od površine kompleksa. Optimizacija geometrije kompleksa i molekulsko-dinamičke simulacije provedene su unutar programa AMBER14.[96] Korišteni su periodični rubni uvjeti, a elektrostatske interakcije računate su metodom PME. Kompleksi su prvo optimizirani koristeći metode najstrmijeg spusta i konjugiranih gradijenata. Nakon optimiranja svaki sustav je zagrijavan, pri čemu je temperatura linearno povećana od 0 K do 300 K u uvjetima NVT u periodu od 30 ps. Nakon uravnoteženja kompleksi su simulirani 300 ns korištenjem uvjeta NPT pri temperaturi od 300 K i tlaku od 1 atm, korištenjem Langevinovog termostata s frekvencijom sudara 1 ps^{-1}. Algoritam SHAKE[94] korišten je za ograničenje vibracija veza u kojima sudjeluju atomi vodika.

Nakon završenih molekulsko-dinamičkih simulacija, analizirane su trajektorije oba kompleksa enzima MAO B. Kako bi provjerili stabilnost simuliranih kompleksa izračunata je vrijednost RMSD (engl. *root mean squared deviation,* RMSD) tijekom vremena, koja govori o tome koliko se struktura proteina promijenila tijekom simulacija u odnosu na referentnu strukturu (Slika 22).[148] Za referentnu strukturu uzeta je optimirana struktura enzima MAO B u kompleksu s odgovarajućim supstratom.

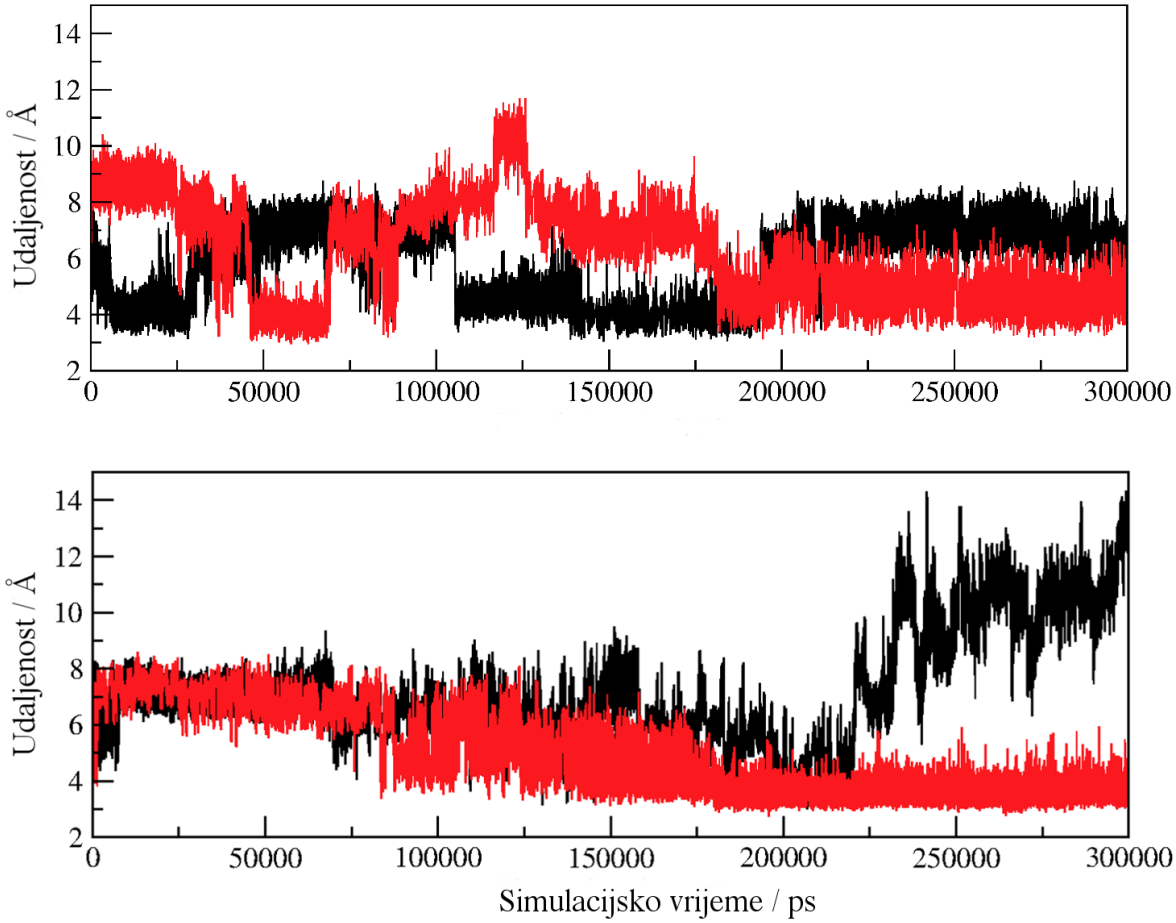


Slika 22. Vrijednosti RMSD za enzim MAO B u kompleksu s monokationima HIS (crveno) i NMH (crno) tijekom 300 ns molekulsko-dinamičkih simulacija.

Vrijednosti RMSD za MAO B u kompleksu s oba supstrata ne razlikuju se mnogo međusobno. Uočeno je kako se nakon inicijalnih 150 ns, vrijednosti RMSD klasteriraju oko 2,5 Å za oba kompleksa.

Zatim je praćena orijentacija oba supstrata u aktivnom mjestu enzima MAO B u odnosu na kofaktor FAD. Konkretno, praćena je udaljenost između reaktivnog α-ugljika na supstratu i atoma N5 na kofaktoru enzima, s obzirom na to da ova dva atoma sudjeluju u prijenosu hidrida[34-35,149] te se praćenjem dane udaljenosti zapravo može pratiti povoljna orijentacija supstrata za reakciju. Pokazano je kako u kompleksu enzima MAO B sa supstratom **NMH** u svakom trenutku, barem u jednoj podjedinici, postoji reaktivna orijentacija supstrata u odnosu na kofaktor FAD. Reaktivna udaljenost između α-ugljika supstrata i atoma N5 kofaktora FAD iznosi oko 3-4 Å. Ova vrijednost je u suglasnosti s udaljenosti od 3,198 Å između dopamina i kofaktora enzima MAO B koja je izračunata u okviru QM-klaster pristupa.[34] S druge strane, simulacije sa supstratom histaminom pokazale su da u jednoj podjedinici enzima MAO B,

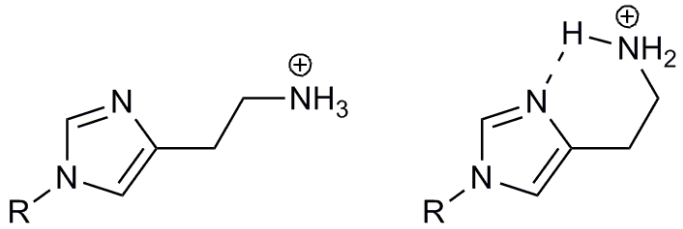
supstrat nikada ne postiže pravilnu orijentaciju u odnosu na kofaktor FAD; prvih 200 ns udaljenost α-C(supstrat)-N5(FAD) znatno je iznad 4 Å, a zatim u posljednjih 100 ns dana udaljenost se kreće između 8-14 Å (Slika 23). Prosječne vrijednosti za udaljenost α-C(supstrat)-N5(FAD) tijekom 300 ns MD simulacija iznose 4,994 Å i 6,224 Å za **NMH**, te 5,820 i 7,243 Å za **HIS,** što upućuje na to da je **NMH** bolje orijentiran prema kofaktoru FAD u usporedbi s **HIS**.[148]



Slika 23. Udaljenost α-C(supstrat)-N5(FAD) praćena je tijekom 300 ns simulacija MD. Gore je prikazan enzim MAO B u kompleksu s monokationom NMH dok je kompleks s monokationom HIS prikazan ispod.

Nakon toga primijećeno je kako **NMH** tijekom molekulsko-dinamičkih simulacija dominantno ima ciklički oblik u aktivnom mjestu enzima MAO B za koji je karakteristična intramolekulska vodikova veza između etilamino skupine i imino dušika na imidazolu (Shema 3). S druge

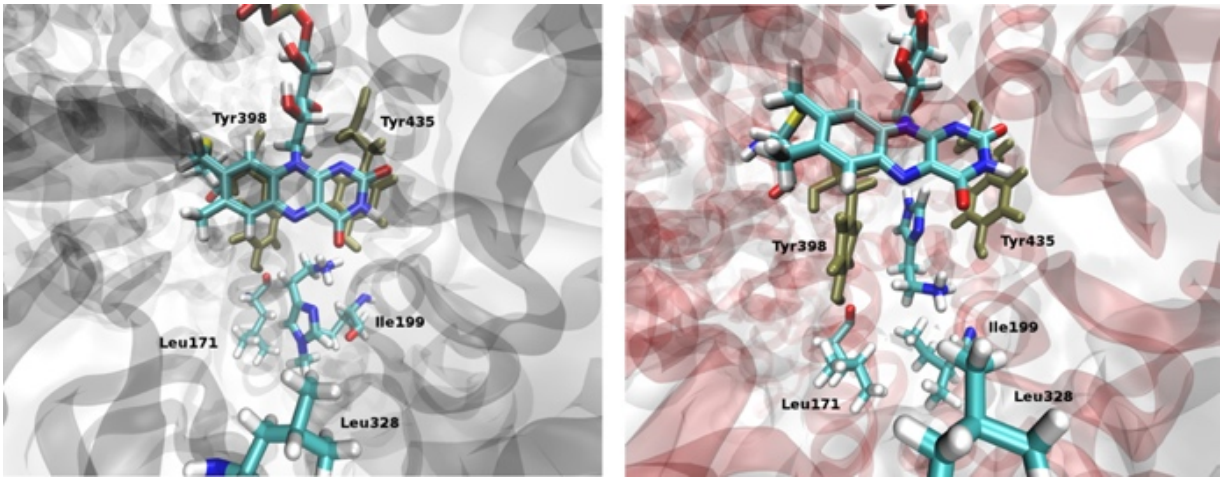
strane, **HIS** ima dominantno linearni oblik u veznom mjestu enzima MAO B što odgovara i njegovom dominantnom obliku u otopini pri fiziološkom pH.[17,150]



Shema 3. Linearni i ciklički oblici monokationskog histamina (HIS, R=H) i *N*-metilhistamina (NMH, R = metil).

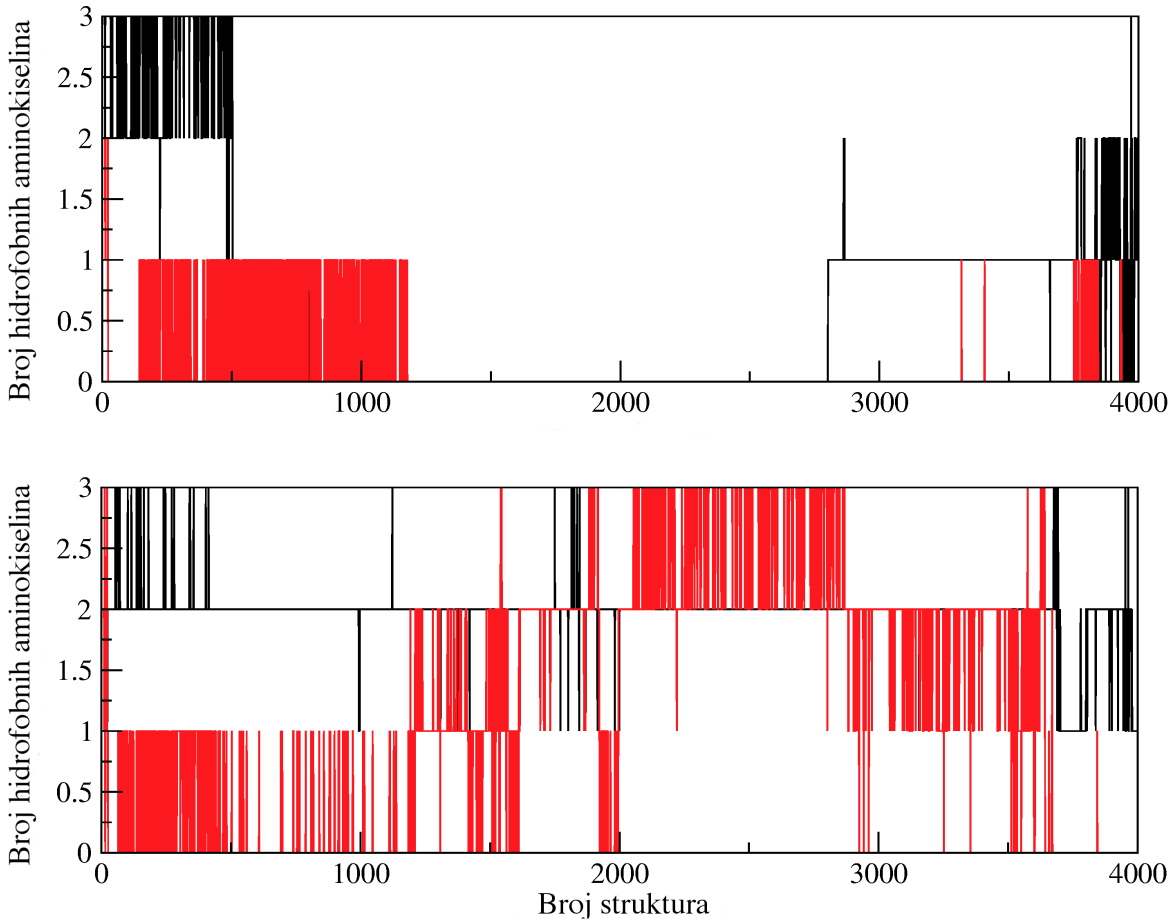
Prosječne udaljenosti između relevantnih dušika na etilamino skupini te na imidazolnom prstenu *N*-metilhistamina i histamina iznose 3,403 Å i 4,043 Å za **NMH** te 4,490 Å i 4,745 Å za **HIS** u obje podjedinice enzima, što upućuje na tendenciju k formiranju intramolekulske vodikove veze kod supstrata **NMH**.

Vrijednosti pK_a imino dušika *N*-metilhistamina i histamina su identične (pK_a = 5,8)[151] dok je vrijednost pK_a etilamino skupine **NMH** nešto niža u odnosu na **HIS** (p$K_{a(NMH)}$ = 9,57, p$K_{a(HIS)}$ = 9,75)[151] što sugerira nešto manju bazičnost odgovarajuće –NH3$^+$ skupine kod **NMH**. Zbog toga kationska skupina supstrata **NMH** ima veću sklonost k formiranju intramolekulske vodikove veze u usporedbi s **HIS**. Ciklički oblik *N*-metilhistamina osigurava mu rigidniju formu zbog čega **NMH** češće uspostavlja reaktivnu konformaciju u aktivnom mjestu enzima (Shema 3). S druge strane, linearni oblik **HIS** rezultira različitim konformacijama histamina i orijentacijama u aktivnom mjestu koje nisu nužno reaktivne. Imidazolni prsten histamina ima N-H skupinu koja može formirati vodikovu vezu ili s aminokiselinama aktivnog mjesta ili s kofaktorom. S druge strane, **NMH** ima metilnu skupinu vezanu za imidazolni dušik (N-CH_3). Upravo N-H skupina histamina ostvaruje vodikovu vezu s karbonilom iz kofaktora FAD koji se nalazi u susjedstvu reaktivnog atoma N5 (Slika 6) što rezultira nereaktivnom konformacijom i orijentacijom histamina u aktivnom mjestu enzima MAO B. Spomenuta orijentacija histamina je dodatno stabilizirana formiranjem π···π *stacking* interakcija između imidazola histamina te bočnih ogranaka Tyr398 i Tyr435, aminokiselina koji formiraju strukturu tipa "aromatskog kaveza" (Slika 24).[148]



Slika 24. Reprezentativne strukture najzastupljenijeg klastera enzima MAO B u kompleksu s *N*-metilhistaminom (lijevo) i histaminom (desno). *N*-metilhistamin je pravilno orijentiran za kemijsku reakciju usmjeravajući svoju etilamino skupinu prema atomu N5 kofaktora FAD.

Zamjena imidazolnog vodika metilnom skupinom kod supstrata snažno favorizira hidrofobne interakcije u aktivnom mjestu enzima MAO B za koje je pokazano da je hidrofobno.[147] Identificirane su bočne skupine Leu171, Ile199 i Leu328 koje ostvaruju hidrofobne kontakte s metilnom skupinom supstrata **NMH** što doprinosi njegovoj pravilnoj orijentaciji za reakciju u aktivnom mjestu enzima. Kako supstrat histamin nema danu metilnu skupinu, ne ostvaruju se povoljne hidrofobne interakcije te se histamin slobodno rotira u aktivnom mjestu zauzimajući razne neproduktivne orijentacije. Analizom učestalosti pojavljivanja Ile199, Leu171 i Leu328 u radijusu od 5 Å od imino dušika imidazolnog prstena oba supstrata, **HIS** i **NMH**, jasno se uočava kako je **NMH** u kontaktu s danim hidrofobnim aminokiselinama (Slika 24). Naime, **NMH** tijekom MD simulacija uvijek formira barem jedan hidrofobni kontakt s jednom od tri analizirane aminokiseline aktivnog mjesta, ali često i sa sve tri (Slika 24). S druge strane, **HIS** ne ostvaruje interakcije niti s jednom od tri hidrofobne aminokiseline tijekom polovice simuliranog vremena, dok u preostalom simulacijskom vremenu ostvaruje u prosjeku samo jedan kontakt s jednom od tri aminokiseline (Slika 25).[148]



Slika 25. Učestalost pojavljivanja Ile199, Leu171 i Leu328 u radijusu od 5 Å od imino dušika imidazolnog prstena HIS (gore) i NMH (dolje), u obje podjedinice (prikazano crvenom i crnom bojom) tijekom 300 ns MD simulacija. Analiziran je svaka 75. struktura zbog preglednosti prikazane slike.

Posebno su značajne interakcije **NMH** s Ile199, koja je nazvana usmjeravajućom aminokiselinom (engl. *gating residue*).[9,144] Ile199 je očuvana aminokiselina u svim primarnim strukturama enzima MAO B osim kod MAO B iz goveda koji na danoj poziciji ima fenilalanin. Pretpostavlja se da Ile199 u svojoj "zatvorenoj orijentaciji" razdvaja hidrofobni ulazak i vezno mjesto za supstrat u enzimu MAO B stvarajući na taj način bipartitnu konfiguraciju aktivnog mjesta, dok u svojoj "otvorenoj orijentaciji" dozvoljava spajanje oba mjesta što definira selektivnost prema supstratima i inhibitorima.[144]

Kako bi se dobile detaljne informacije o energetskim doprinosima koji determiniraju selektivnost enzima MAO B primijenjena je metoda MM-PBSA za izračun Gibbsove energije vezanja oba supstrata (Tablica 4).[148] Ova metoda je odabrana za proučavanje supstratne selektivnosti enzima MAO B s obzirom na to da se prethodno pokazala uspješnom u ispitivanju potentnosti selektivnih inhibitora ovog enzima.[152]

Tablica 4. Izračunate Gibbsove energije vezanja ($\Delta G^{o}_{vezanja}$) metodom MM–PBSA i njezini doprinosi (vrijednossti su dane u kcal mol^{-1}).

	ΔE_{MM}	$\Delta_{solv}G^{o}$	ΔH^{o}	$T\Delta S^{o}$	$\Delta G^{o}_{vez.}$ [a]	$\Delta G^{o}_{vez.,\ EKSP}$ [b]
HIS	-154,1	141,5	-12,6	-15,3	2,8 ± 0,8	-3,3
NMH	-154,7	133,3	-21,4	-15,8	–5,6 ± 0,5	-5,2

a Standardna pogreška srednje vrijednosti (engl. *standard error of the mean*) SE je izračunata kao SE = SD / √(veličina uzorka), gdje je SD standardna devijacija, a veličina uzorka je 100 struktura.
b Eksperimentalni rezultati.[20]

Gibbsova energija vezanja ($\Delta G^{o}_{vezanja}$) jasno pokazuje kako je **NMH** bolje vezan u aktivnom mjestu enzima MAO B što je evidentno iz negativnog predznaka vrijednosti $\Delta G^{o}_{vezanja}$. Izračunata vrijednost* od -5,6 kcal mol^{-1} je gotovo identična eksperimentalno dobivenoj vrijednosti od -5,2 kcal mol^{-1}. (ref. 20) S druge strane, izračunata $\Delta G^{o}_{vezanja}$ za **HIS** nije u potpunom skladu s eksperimentalno procijenjenom vrijednosti, međutim dobiveni trend izračunatih vrijednosti upućuje na nedvojbeno bolje vezanje **NMH** u odnosu na **HIS**.[148]

Razlike u MAO B selektivnosti prema **NMH** i **HIS** potječu iz entalpijskog doprinosa Gibbsovoj energiji vezanja, ΔH^{o}, dok je entropijski doprinos $T\Delta S^{o}$ gotovo jednak. S obzirom na entalpijski doprinos, vrijednost $\Delta_{solv}G^{o}$ u slučaju supstrata *N*-metilhistamina je manje pozitivna što rezultira više egzergonim vezanjem **NMH** u odnosu na **HIS**. Rezultati sugeriraju da je arhitektura aktivnog mjesta enzima MAO B bolje podešena za vezanje **NMH**, što je i evidentno iz identificiranih hidrofobnih interakcija koje su odgovorne za pravilno pozicioniranje **NMH** za reakciju u aktivnom mjestu enzima.

Iako izračunate vrijednost objašnjavaju selektivnost enzima, razlika između izračunate $\Delta G^{o}_{vezanja}$ i eksperimentalno dobivene $\Delta G^{o}_{vezanja}$ za **HIS** je 6,1 kcal mol^{-1}. Eksperimentalna vrijednost za $\Delta G^{o}_{vezanja}$ za **HIS** je negativna ($\Delta G^{o}_{vezanja} < 0$), što sugerira da je vezanje **HIS** energetski povoljan proces, dok je izračunata vrijednost pozitivna ($\Delta G^{o}_{vezanja} > 0$), što indicira da je vezanje **HIS** u aktivnom mjestu enzima MAO B nepovoljno. S druge strane, eksperimentalne vrijednosti $\Delta G^{o}_{vezanja}$ za oba supstrata su negativne, što upućuje na to da postoji kompeticija kada su oba supstrata na raspolaganju enzimu MAO B, s tim što je vrijednost $\Delta G^{o}_{vezanja}$ za oko 2 kcal mol^{-1} više egzergona za fiziološki supstrat *N*-metilhistamin. Stoga,

* Izračunate vrijednosti dane su u kcal mol^{-1}. Kako bi se dobile vrijednosti izražene u kJ mol^{-1} treba koristiti faktor konverzije 1 kcal mol^{-1}= 4,184 kJ mol^{-1}.

izračunate vrijednosti trebaju se na prvom mjestu promatrati s aspekta njihovog međuodnosa, koji nedvojbeno upućuje na to da je *N*-metilhistamin bolji supstrat za enzim MAO B.

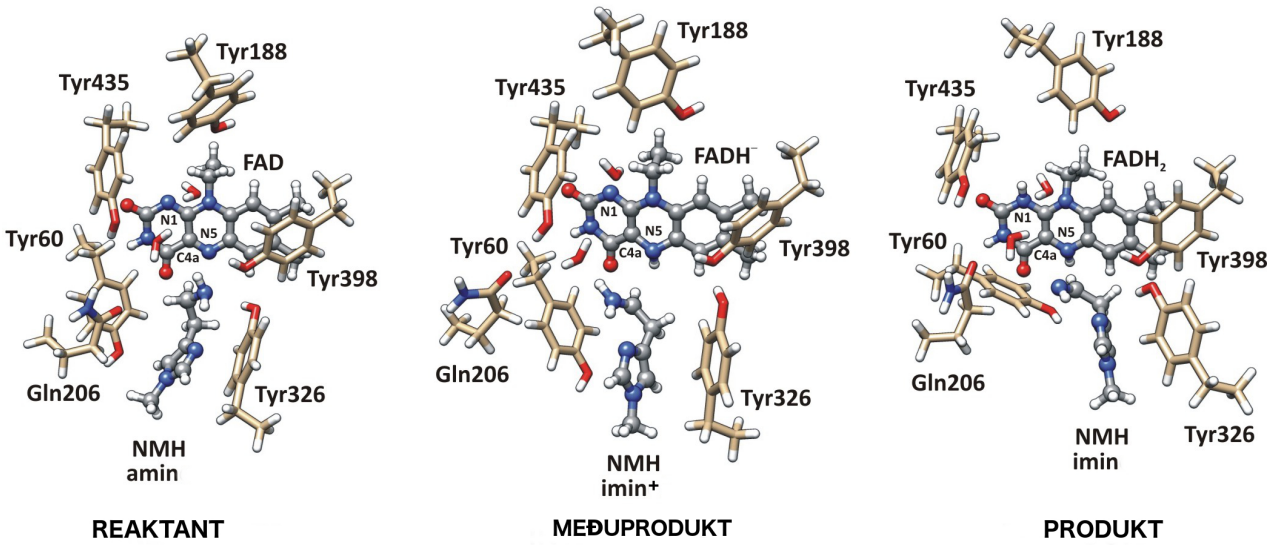
4.2.2. Kvantno-mehanički računi na modelu enzima MAO B

Nakon provedenih molekulsko-dinamičkih simulacija odabrano je nekoliko struktura enzima u kompleksu s **NMH** odnosno **HIS**, u kojima supstrati imaju pravilnu orijentaciju za reakciju. Nakon toga izrezan je dio iz strukture kompleksa koji predstavlja aktivno mjesto enzima. Model enzima se sastojao iz kofaktora FAD, odgovarajućeg supstrata te aminokiselina Tyr60, Tyr188, Tyr326, Tyr398, Tyr435 i Gln206 zajedno s dvije molekule vode čije pozicije su odgovarale kristalnim vodama, a za koje je pokazano da su na pravom mjestu kako bi bile uključene u reakciju.[34,153] Kofaktor FAD je odsječen na etilnoj skupini koja je vezana za atom N10 kofaktora (Slika 6), dok su odabrane aminokiseline odsječene na njihovim α-ugljicima, koji su zatim zadržani u strukturi u formi metilne skupine. Pozicije α-C atoma aminokiselina držane su "zamrznutima" tijekom kvantno-mehaničkih računa, odnosno dani atomi su fiksirani dok je preostaloj strukturi modela enzima dozvoljeno da se slobodno optimira. Kao što je ranije spomenuto, supstrati enzima MAO B vežu se u kationskoj formi dok u reakciju ulaze isključivo u neutralnoj formi, što je pokazano eksperimentalno[145,154] i računalno.[34,35,149,155,156]

Kako bi smanjili grešku pri odabiru početne konformacije modela enzima u kompleksu sa supstratom odabrano je nekoliko početnih konformacija iz MD simulacija, a u mehanističke račune krenulo se s najstabilnijom konformacijom kompleksa enzima s jednim odnosno drugim supstratom. Kako bi dobivene rezultate stavili u isti kontekst s prethodnim istraživanjima provedenim na istom enzimu u kompleksu s drugi supstratima,[34,35,153] te kako bi se postigao kompromis između preciznosti računa i računalne izvedivosti, sve geometrije su optimirane koristeći M06–2X/6–31G(d) razinu teorije pri čemu su termalne korekcije za standardnu Gibbsovu energiju dobivene odgovarajućim frekvencijskim računom. Konačne energije na fiksnoj geometriji su dobivene koristeći 6-311++G(2df,2pd) osnovni skup, uz primjenu funkcionala M06-2X, BMK, PBE0 i B3LYP. PBE0 je rezultirao najboljim slaganjem s eksperimentalnom vrijednosti te je zajedno s rezultatima dobivenim primjenom funkcionala BMK i B3LYP, dao nižu barijeru od one koja je dobivena koristeći funkcional M06-2X. Zbog toga su rezultati dobiveni primjenom funkcionala PBE0 diskutirani kroz tekst koji slijedi. Vrijednosti za energije dobivene korištenjem preostalih funkcionala dane su u Tablici S1 u poglavlju 8. te se mogu usporediti s vrijednostima diskutiranim ovdje. Kako bi se uzeli u obzir polarizacijski efekti prouzročeni ostatkom enzima, tijekom svih kvantno-mehaničkih računa

korišten je implicitni polarizacijski model otapala CPCM[106] s dielektričnom konstantom $\varepsilon = 4$, dok su preostali parametri odgovarali čistoj vodi. Ovakav pristup u ispitivanju katalitičkih mehanizma mnogih enzima koristili su Siegbahn, Himo i koautori[117, 157] Sve navedeno rezultira razinom teorije (CPCM)/PBE0/6–311++G(2df,2pd)//(CPCM)/M06-2X/6–31G(d).

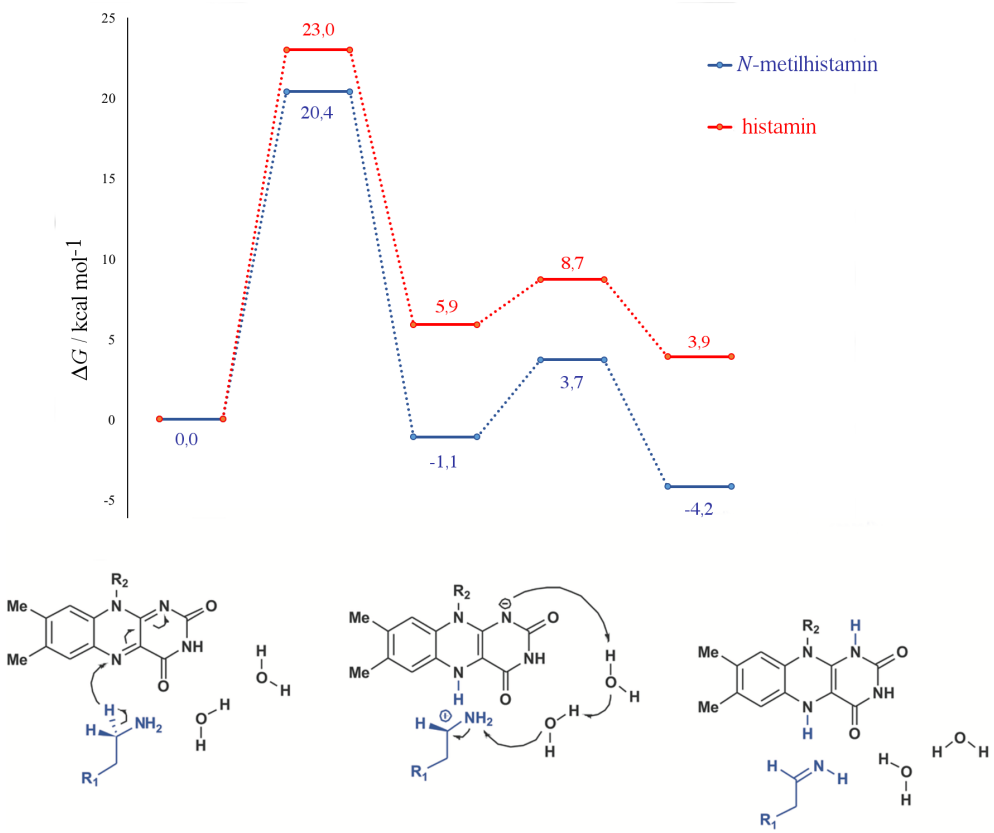
Validnost upotrebe kvantno-mehaničkih računa u okviru klaster pristupa nedavno su potvrdili Warshel[158] i Martinez[159] i njihovi suradnici. Oni su pokazali kako pristup QM/MM, koji podrazumijeva cijelu strukturu enzima pri modeliranju enzimski katalizirane reakcije, nije osjetljiv na veličinu kvantno-mehaničkog dijela ukoliko je odabrana dovoljno velika regija QM koja adekvatno opisuje proučavanu kemijsku reakciju. Zbog toga optimalno velika kvantno-mehanička regija u kombinaciji s implicitnim polarizabilnim kontinuumom koji predstavlja ostatak enzima treba dati vjerodostojne rezultate pri opisu kemijske reakcije. Modelirana reakcija je podrazumijevala prijenos hidrida s α-ugljika supstrata na atom N5 modela kofaktora FAD. Sve prijelazne strukture provjerene su imaju li po jednu odgovarajuću imaginarnu frekvenciju. Dobivene prijelazne strukture zatim su korištene kao ulazne strukture za račun IRC kako bi se provjerilo spaja li dana sedlasta točka odgovarajuće minimume. Atomski naboji su izračunati pomoću analize NBO[160] (engl. *natural bond orbital,* NBO) kao računi *single point* primjenom razine teorije (CPCM)/M06-2X/6–31G(d). Kvantno-mehanički računi rezultirali su stacionarnim točkama prikazanim na Slici 26.[148]



Slika 26. Strukture relevantnih stacionarnih točaka za razgradnju *N*-metilhistamina (NMH) enzimom MAO B dobivenih primjenom kvantno-mehaničkog klaster pristupa na modelu enzima. Geometrije odgovarajućih kompleksa sa supstratom HIS su analogne.

U reaktantima, oba supstrata ostvaruju vodikove veze s Tyr326 i Tyr398 koje su formirane između N(imino iz prstena)-O(OH iz Tyr326) i N(amino skupina iz etilamino lanca)-O(OH iz Tyr398). U slučaju supstrata **HIS** te udaljenosti su 2,783 Å i 3,326 Å, a u slučaju **NMH** nešto su kraće i iznose 2,730 Å i 3,015 Å. Dakle, vrijednosti dobivene iz računa na pojednostavljenoj reprezentacija enzima pokazuju da je **NMH** bolje smješten u aktivnom mjestu enzima MAO B u odnosu na **HIS**. Međutim, reaktivni ugljik, α-C, *N*-metilhsitamina nešto je udaljeniji od reaktivnog centra N5 na kofaktoru FAD (αC-N5 = 3,452 Å; αH -N5 = 2,933 Å), u odnosu na histamin (αC-N5 = 3,300 Å; αH-N5 = 2,671 Å).

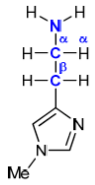
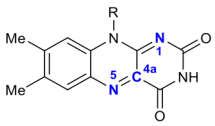
Direktni prijenos hidrida je moguć u slučaju oba supstrata (Slika 27), što je u suglasnosti s ranijim rezultatima dobivenim na dopaminu[34,35] i noradernalinu.[149] U prijelaznoj strukturi, hidrid koji se prenosi nalazi se između α-ugljika na supstratu i atoma N5 na modelu kofaktora FAD. Za histamin te udaljenosti iznose 1,419 Å i 1,225 Å, dok su u slučaju *N*-metilhistamina, udaljenosti 1,398 Å i 1,235 Å. Gibbsova energija za prijenos hidrida iznosi 20,4 kcal mol^{-1} (ν_{imag} = 1414*i* cm^{-1}) za **NMH**, odnosno 23,0 kcal mol^{-1} (ν_{imag} = 1260*i* cm^{-1}) za **HIS**,[148] što je u potpunom slaganju s eksperimentalno određenom aktivnosti enzima prema promatranim supstratima.



Slika 27. Profili za reakciju oksidativne deaminacije histamina (crveno) i *N*-metilhistamina (plavo) kataliziranu enzimom MAO B u okviru pristupa QM-klaster.

Iz analize atomskih naboja (Tablica 5) vidi se da je ovaj proces povezan s prijenosom hidridnog aniona (H^-). U reaktantima, ukupni naboji na supstratu **NMH** i modelu kofaktora FAD su 0,03 i -0,03, koji se zatim mijenjaju te u prijelaznoj strukturi iznose 0,30 i -0,31, što pokazuje kako tijekom reakcije **NMH** gubi jednu trećinu elektrona koji se zatim akomodira na kofaktoru FAD. Zatim, naboj na dušiku N5 kofaktora FAD mijenja se od -0,36 u reaktantima do -0,48 u prijelaznoj strukturi. Ovo je u suglasnosti s elektrofilnom prirodom atoma N5, a koja je prethodno pokazana u istraživanju koje je podrazumijevalo računalno ispitivanje mehanizma inhibicije enzima MAO B ireverzibilnim inhibitorima kao što su rasagilin, selegin i klorgilin.[161,162]

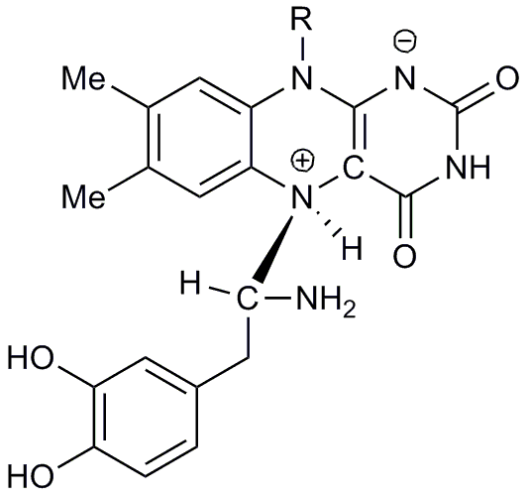
Tablica 5. Preraspodjela naboja tijekom prijenosa hidrida kataliziranog enzimom MAO B izračunata primjenom analize NBO na razini teorije (CPCM)/M06–2X/6–31G(d).

Sistem	Atom/Molekula	Izolirani spoj	Reaktanti	TS	Međuprodukt
	N(amino)	–0,94	–0,95	–0,80	–0,69
	α–H	0,23	0,24	0,33	0,43
	α–C	–0,26	–0,27	–0,07	0,27
	β–C	–0,51	–0,51	–0,52	–0,57
	***N*-methilhistamin**	0,00	0,03	0,30	0,84
	N5	–0,35	–0,36	–0,48	–0,67
	C4a	0,12	0,13	–0,06	–0,11
	N1	–0,67	–0,67	–0,71	–0,73
	kofaktor FAD	0,00	–0,03	–0,31	–0,89

Naboj na α-ugljiku supstrata, s kojeg se prenosi hidridni anion H^-, ne mijenja se značajno, od 0,23 do 0,33, što se može objasniti blizinom susjedne amino skupine koja stabilizira nastali karbokation kroz elektron donirajući efekt. Ovo se ogleda u reduciranom naboju na dušiku iz amino skupine te u skraćenoj udaljenosti između atoma (amino)N-αC, koji se skupa mijenjaju od -0,95 i 1,495 Å u reaktantima, dok u prijelaznoj strukturi ove vrijednosti iznose -0,80 i 1,349 Å, što je u suglasnosti s predloženim prijenosom hidrida.

Važno je prodiskutirati preraspodjelu naboja u reaktantima u kontekstu polarnog nukleofilnog mehanizma koji je također predložen kao mogući mehanizam reakcije, a po kom se oksidacija amina odigrava uz prijenos protona (H^+) s α-ugljika supstrata.[27] Ovaj mehanizam ovisi o prisutnosti jake baze u aktivnom mjestu enzima koja bi mogla primiti proton, s obzirom na to da reaktivni αC-H dio supstrata ima vrijednost pK_a 25.[163] Strukturna analiza je pokazala da u aktivnom mjestu enzima nema aminokiseline ili strukturnog motiva na kofaktoru koji bi imao ulogu jake baze koja bi mogla primiti proton. Edmondson i suradnici su stoga predložili kako se tijekom reakcije planarni kofaktor FAD svija za 30° što povećava bazičnost na atomu N5 i smanjuje gustoću elektrona na susjednom atomu C4a kofaktora FAD što olakšava nastanak kompleksa N(amino skupina supstrata)-C4a(FAD) nakon čega dolazi do prijenosa protona na atom N5 flavina.[8] Međutim, eksperimentalno nikada nije identificiran predloženi kovalentni međuprodukt. Kako bi se ispitala mogućnost ovog mehanizma, simulirana je reakcija između atoma N iz amino skupine **NMH** i atoma C4a iz kofaktora FAD, krenuvši od udaljenosti koja je iznosila 2,875 Å u reaktantima pri čemu se udaljenost smanjivala u koracima od po 0,1 Å. Navedeni postupak nije rezultirao opisanim kovalentnim međuproduktom N(amino skupina supstrata)-C4a(FAD), a ukupna energija porasla je do vrijednosti iznad 40 kcal mol^{-1}. Analiza geometrije flavina u reaktantima potvrdila je kako je kofaktor FAD planaran. Ovi rezultati zato opovrgavaju nukleofilni mehanizam koji je predložen od strane Edmondsona i suradnika te idu u prilog direktnom hidridnom mehanizmu za reakciju oksidacije amina kataliziranu enzimom MAO B, što je sukladno rezultatima iz prethodno objavljenih računalnih[34,35,153] i eksperimentalnih istraživanja.[41]

Nakon prijenosa hidrida proučavani sustav se relaksira do međuprodukta (Slike 26 i 27), koji se karakterizira polureduciranim anionskim flavinom ($FADH^-$) i kationskim supstratom. Ovo je evidentno iz preraspodjele naboja na formiranom međuproduktu, gdje je ukupni naboj na flavinu -0,89, dok je ukupni naboj na **NMH** u međuproduktu 0,84. Reakcija s **NMH** je povoljnija ($\Delta_r G^o$ = -1,1 kcal mol^{-1}) u odnosu na reakciju s **HIS**, koja je endergona ($\Delta_r G^o$ = 5,9 kcal mol^{-1}) (Slika 27).[148] U ovom dijelu važno je naglasiti razliku u stvaranju međuprodukta koji nastaje u reakciji s dopaminom[34] u odnosu na međuprodukt nastao u reakciji s **NMH** i **HIS**. U reakciji s dopaminom pokazano je kako se spontano formira stabilni kovalentni adukt između atoma N5 flavina i α-ugljika supstrata (Slika 28), dok u reakciji sa supstratima **NMH** i **HIS** takav adukt nije identificiran tijekom prijenosa hidrida na atom N5 kofaktora FAD.



Slika 28. Shematski prikaz stabilnog kovalentnog adukta dopamina i flavinskog kofaktora tijekom prijenosa hidrida u reakciji oksidacije dopamina enzimom MAO B.

U sljedećem koraku oksidacije dopamina enzimom MAO B, kovalentni adukt se raspada istovremeno s deprotoniranjem slobodne amino skupine. Stvaranje kovalentnog adukta objašnjava zašto mnogi alkil- i arilaminski supstrati postaju inhibitori enzima MAO B nakon što se izvrši *N*,*N*-dimetilacija danih supstrata.[164] U reakciji s **NMH** i **HIS** ne nastaje kovalentni adukt, već su kationski **NMH** i **HIS** udaljeni od flavina 2,872 Å, odnosno 2,575 Å. Međutim, računi pokazuju kako je stvaranje adukta moguće, s tim što je takav proces povezan s barijerom od 5,2 kcal mol^{-1} za **NMH**, odnosno 4,9 kcal mol^{-1} za **HIS**, a odgovarajući adukti manje su stabilni od inicijalnih međuprodukata (2,5 kcal mol^{-1} za **NMH**, odnosno 3,1 kcal mol^{-1} za **HIS**). Sve navedeno ide u prilog tome kako stvaranje kovalentnog adukta identificiranog u oksidaciji dopamina nije karakteristično za oksidaciju **NMH** i **HIS** te da se deprotoniranje amino skupine u sljedećem koraku odvija bez prethodnog stvaranja kovalentnog adukta.

Sljedeći korak u oksidaciji amina uključuje deprotoniranje amino skupine supstrata pomoću atoma N1 kofaktora FAD, koje je posredovano s dvije molekule vode (Slika 26). U reakciji sa supstratom **NMH**, udaljenosti između spomenutih voda i **NMH** iznose N(NMH)-O(voda1) = 2,690 Å te O(voda1)-O(voda2) = 2,733 Å, odnosno O(voda2)-N1 = 2,736 Å, što omogućava deprotoniranje amino skupine od strane bazičnog atoma N1 kofaktora FAD[34] koje je potpomognuto molekulama vode. Ovakav process deprotoniranja se odvija pomoću Grotthussovog mehanizma.[165] Kod supstrata **NMH**, ovaj proces praćen je barijerom od 4,8 kcal mol^{-1} (ν_{imag} = 792*i* cm^{-1}), koja je nešto niža za reakciju s **HIS** te iznosi 2,8 kcal mol^{-1} (ν_{imag} = 834*i* cm^{-1}). Ovo pokazuje kako je barijera za deprotoniranje amino skupine znatno niža od

barijere za prijenos hidrida, što sugerira da je prijenos hidrida korak koji određuje brzinu (engl. *rate limiting step*) sveukupne reakcije, što je u potpunom slaganju s ranijim računalnim[34,35,153] i eksperimentalnim istraživanjima.[41] Niska barijera u drugom koraku može se objasniti pomoću vrijednosti pK_a. Naime, protonirani imini imaju znatno kiseliju N-H skupinu (pK_a≈5-7),[163] od neutralnih imina ili amina dok je za poziciju N1 na polureduciranom kofaktoru $FADH^-$ eksperimentalno procijenjena vrijednost od pK_a≈7,[166] što omogućava prijenos protona. Nakon deprotoniranja, sustav se stabilizira za 4,8 kcal mol^{-1} u slučaju **HIS**, odnosno 7,9 kcal mol^{-1} u slučaju **NMH**, što čini cijelu reakciju izvedivijom za supstrat **NMH** (Slika 27). Drugim riječima, ukupna transformacija **NMH** je egzergona $\Delta_r G^o$ = -4,2 kcal mol^{-1}, dok je transformacija **HIS** endergona $\Delta_r G^o$ = 3,9 kcal mol^{-1}, što također objašnjava bolju aktivnost enzima MAO B prema **NMH** u odnosu na **HIS**. Također, ukupni profil za oksidaciju **NMH** odvija se nizbrdo (engl. *downhill*) sa stacionarnim točkama koje imaju relativnu energiju 0,0 kcal mol^{-1} (reaktanti), -1,1 kcal mol^{-1} (međuprodukti) i -4,2 kcal mol^{-1} (produkti). Reakcija rezultira neutralnim iminom i potpuno reduciranim kofaktorom $FADH_2$ kao finalnim produktima (Slika 26). Nakon što se FAD reducira do $FADH_2$ slijedi regeneracija kofaktora molekulskim kisikom O_2 uz stvaranje H_2O_2 u reakciji za koju su potrebna dva vodika. Ova činjenica također daje prednost prijenosu hidrida u odnosu na druge predložene mehanizme u kojima se flavin reducira samo do ($FADH^-$).[27,153,164] Nastali imin zatim izlazi iz aktivnog mjesta enzima i u otopini se dalje neenzimski hidrolizira do odgovarajućeg aldehida.[167]

Na kraju, bitno je staviti komentirane rezultate u odgovarajuću perspektivu. Na prvi pogled, izračunate barijere za oksidaciju supstrata $\Delta^‡G^o_{(NMH)}$= 20,4 kcal mol^{-1}, odnosno $\Delta^‡G^o_{(HIS)}$ = 23,0 kcal mol^{-1}, izgledaju precijenjeno u odnosu na eksperimentalno dobivene vrijednosti $\Delta^‡G^o_{(eksp,\ NMH)}$ = 17,8 kcal mol^{-1} i $\Delta^‡G^o_{(eksp,\ HIS)}$ = 19,2 kcal mol^{-1}. (ref. 20) Međutim, izračunate $\Delta^‡G^o$ vrijednosti za oba supstrata ulaze u veličinu greške od 5 kcal mol^{-1} za metodu QM-klaster koja je procijenjena od strane Siegbahna i koautora, na temelju proučavanja mehanizama velikog broja enzima.[115] Izračunate vrijednosti mogu se poboljšati u smjeru slaganja s eksperimentalno izračunatim vrijednostima uključivanjem ostatka enzima u račune. Međutim, već primjenom pristupa QM-klaster u proučavanju mehanizma enzimski katalizirane reakcije može se racionalizirati selektivnost enzima MAO B prema **NMH** u odnosu na **HIS** te u tom kontekstu veoma mala eksperimentalno dobivena razlika $\Delta\Delta^‡G^o_{(eksp)}$=1,4 kcal mol^{-1} je dobro računalno reproducirana $\Delta\Delta^‡G^o_{(izračunata)}$=2,6 kcal mol^{-1}. (ref. 148)

U slučaju primijenjene metode QM-klaster za proučavanje oksidacije dopamina[34] dobivena je barijera od $\Delta^{\ddagger}G^{o}_{(izračunata)}$=24,4 kcal mol^{-1}, koja je zatim primjenom metode EVB, koja uzima u obzir cijelu strukturu enzima, rezultirala barijerom od $\Delta^{\ddagger}G^{o}_{(izračunata)}$=16,1 kcal mol^{-1}, (ref. 35) što je vrijednost koja se odlično slaže s eksperimentalnom $\Delta^{\ddagger}G^{o}_{(eksp.)}$=16,5 kcal mol^{-1}. (ref. 20) Stoga, uključivanje ostatka strukture enzima MAO B u proučavanju oksidacije **NMH** i **HIS** trebalo bi rezultirati boljim slaganjem s eksperimentalno dobivenim vrijednostima.

4.2.3. Simulacije EVB reakcije oksidacije katalizirane enzimom MAO B

Metoda EVB omogućava simuliranje enzimski kataliziranih reakcija uzimajući u obzir cijelu strukturu enzima. Glavna prednost metode EVB u odnosu na metodu QM/MM je u tome što omogućava opsežnu konformacijsku pretragu tijekom reakcije, bivajući pri tome znatno manje računalno zahtjevna, pri čemu je bitno da su parametri koji opisuju danu kemijsku reakciju pažljivo odabrani.[168,169] Ovo je omogućeno postupkom kalibracije standardne Gibbsove energije aktivacije i reakcije za referentnu reakciju prije nego se krene s ispitivanjem katalitičkog mehanizma u enzimu.

Enzimska kataliza se definira kao ubrzanje kemijske reakcije u odnosu na referentnu nekataliziranu reakciju u vodenoj otopini.[170] Stoga, kako bi se provele simulacije EVB neophodno je prvo definirati referentnu reakciju, bilo u plinskoj fazi ili u vodenoj otopini, a koja će podrazumijevati reakciju između reaktivnih vrsta. Glavna pretpostavka je da se zatim dana kemijska reakcija odvija u enzimu po istom tom mehanizmu. U slučaju enzima MAO B nema eksperimentalnih podataka za referentnu nekataliziranu reakciju, tj. u literaturi nema podataka o reakciji između flavina i aminskih supstrata u vodenoj otopini. Zbog toga je neophodno prvo modelirati referentnu reakciju za kataliziranu reakciju oksidacije amina enzimom MAO B. Referentna reakcija u plinskoj fazi podrazumijevala je reakciju prijenosa hidrida između modela kofaktora FAD (lumiflavina) i *N*-metilhistamina (odnosno histamina), primjenom razine teorije M06-2X/6-31+G(d,p). Odabir referentne reakcije u plinskoj fazi je standardni protokol. Nakon toga parametriziran je Hamiltonijan EVB na način da reproducira standardne Gibbsove energije aktivacije i reakcije, $\Delta^{\ddagger}G^{o}_{plin}$ i $\Delta_{r}G^{o}_{plin}$, dobivene na razini teorije M06-2X/6-31+G(d,p). Zatim se ista reakcija simulira u vodenoj otopini i enzimu MAO B koristeći iste parametre. Ovo je validna aproksimacija s obzirom na to da je dokazano kako su parametri EVB neovisni o fazi (okolini) u kojoj se provodi reakcija.[171] Navedeni pristup omogućava (i) ispitivanje efekta okoline u kojoj se provodi reakcija na samu reakciju, (ii) procjenu ubrzanja kemijske reakcije u enzimu u odnosu na istu (referentnu) reakciju u vodenoj otopini.

Kako bi se modelirao prijenos hidrida metodom EVB, standardna Gibbsova energija aktivacije ($\Delta^{\ddagger}G^{o}_{plin}$) i reakcije ($\Delta_{r}G^{o}_{plin}$) za referentnu reakciju moraju biti poznate. Stoga je prvo modelirana reakcija između modela kofaktora FAD, lumiflavina i *N*-metilhistamina te histamina, primjenom razine teorije M06-2X/6-31+G(d,p). Početne konformacije sustava u slučaju oba supstrata bile su identične, osim što je supstrat **HIS** imao vodik na imidazolu

umjesto metilne skupine. Prijelazne strukture za danu reakciju u plinskoj fazi potvrđene su frekvencijskom analizom te računima IRC kako bi se dobili odgovarajući reaktanti, odnosno produkti koje povezuje dana odgovarajuća prijelazna struktura. Izračunate vrijednosti prikazane su u Tablici 6. Navedeni računi provedeni su u programu Gaussian09.[125] Svrha računa u plinskoj fazi je računanje standardne Gibbsove energije aktivacije i reakcije za danu reakciju kako bi se kalibrirali parametri EVB, a to su engl. *coupling term* (H_{12}) u Hamiltonijanu EVB i pomak (α_2^0) u potencijalnoj energiji između reaktanta i produkta. To znači da su parametri EVB (H_{12}, α_2^0) parametrizirani na način da reproduciraju $\Delta^{\ddagger}G^{o}_{plin} = 32{,}5$ kcal mol^{-1} i $\Delta_r G^{o}_{plin} = 26{,}3$ kcal mol^{-1} za reakciju s **NMH**, odnosno $\Delta^{\ddagger}G^{o}_{plin} = 33{,}5$ kcal mol^{-1} i $\Delta_r G^{o}_{plin} = 25{,}8$ kcal mol^{-1} za reakciju s **HIS**. Izračunati parametri EVB (Tablica 6) koriste se dalje neizmijenjeni u simuliranju iste reakcije, ali u drugoj sredini, bilo da je riječ o reakciji u vodi ili reakciji u enzimu.

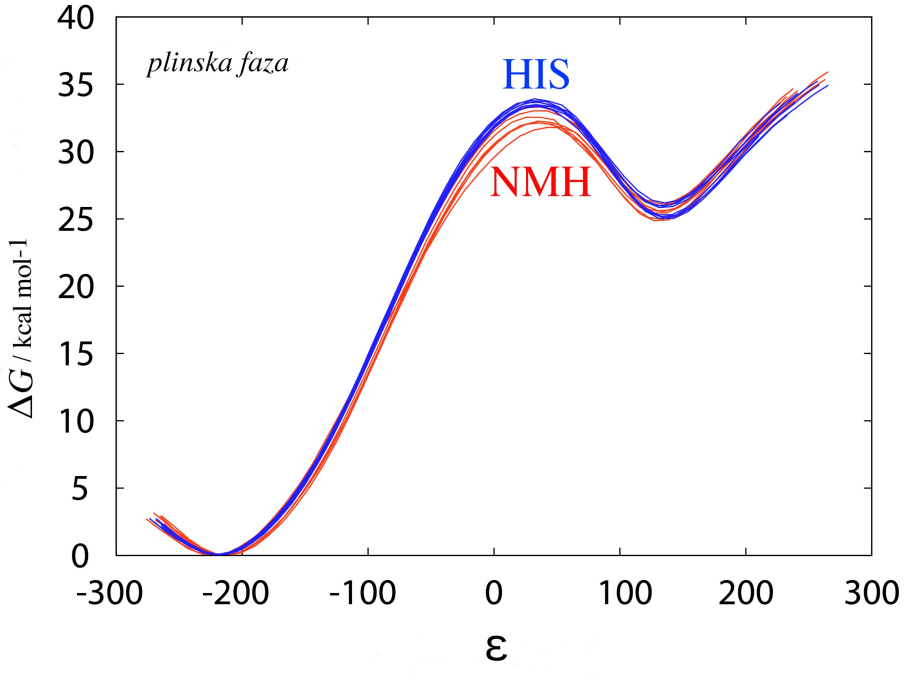
Tablica 6. Izračunate standardne Gibbsove energije aktivacije i reakcije za prijenos hidrida u reakciji oksidacije histamina i *N*-metilhistamina lumiflavinom u plinskoj fazi te parametri EVB koji su izračunati primjenom FEP simulacija iste reakcije u plinskoj fazi usuglašavanjem s danim DFT vrijednostima.

Supstrat	**DFT izračun**		**Kalibrirani EVB parametri**	
	$\Delta^{\ddagger}G^{o}$ / kcal mol^{-1}	$\Delta_r G^{o}$ / kcal mol^{-1}	H_{12} / kcal mol^{-1}	α_2^0 / kcal mol^{-1}
HIS	33,5	25,8	72,8	88,1
NMH	32,5	26,3	74,9	98,5

U oba slučaja, u referentnoj reakciji s **HIS** i **NMH** u plinskoj fazi, geometrija reaktivnog kompleksa i prijelazne strukture je gotovo identična, tako da razlike u izračunatim barijerama potječu isključivo od elektronskog efekta. Ovaj efekt se jednostavno može objasniti elektron donirajućim karakterom metilne skupine u supstratu **NMH** koja osigurava dodatnu stabilizaciju prijelazne strukture koja ima pozitivni naboj u reaktivnom dijelu.

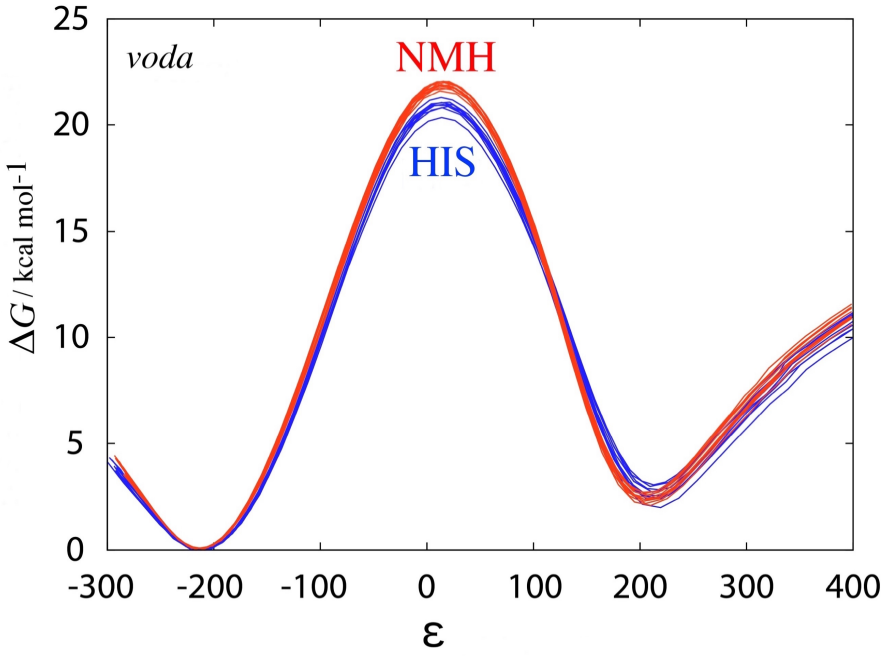
Nakon referentne reakcije u plinskoj fazi provedene su EVB simulacije reakcije oksidacije *N*-metilhistamina i histamina lumiflavinom u plinskoj fazi, temeljem kojih su izračunata dva EVB parametra (Tablica 6). Zbog toga energetski profili (Slika 29) imaju standardne Gibbsove energije aktivacije i reakcije (izračunate u 10 replika za reakciju sa svakim supstratom) jednake onima koje su izračunate koristeći kvantno-mehaničke račune u plinskoj fazi. Razlike između ove dvije reakcije se ogledaju u različitim EVB parametrima za svaku reakciju, na koje su mapirani intrinzini efekti koji su povezani s reaktivnosti. Kako EVB

parametri po konvenciji ne ovise o sredini u kojoj je provedena reakcija, izračunati EVB parametri se dalje neizmijenjeni koriste u simulacijama iste reakcije u vodenoj otopini kao i u enzimu.



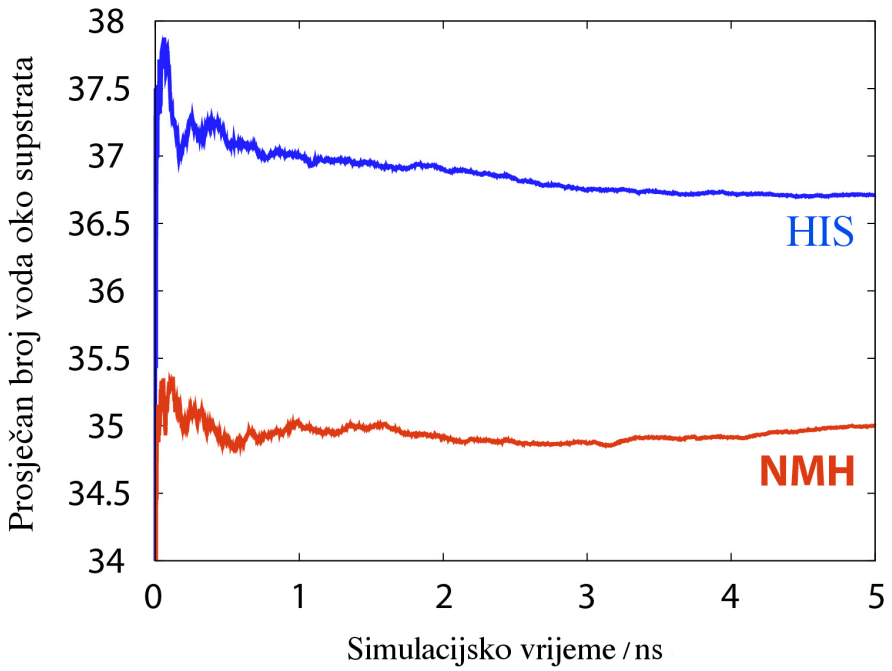
Slika 29. Profili za reakciju oksidacije *N*-metilhistamina i histamina lumiflavinom u plinskoj fazi dobiveni u EVB simulacijama.

Kako proučavana reakcija podrazumijeva preraspodjelu naboja te stvaranje nabijenih spojeva za očekivati je da će prijelazna struktura te produkti reakcije biti više stabilizirani u reakciji koja se provodi u vodi (Slika 30).



Slika 30. Profili za reakciju oksidacije *N*-metilhistamina i histamina lumiflavinom u vodi dobiveni u EVB simulacijama.

Barijere dobivene u simulacijama EVB reakcije u vodi su za oko 12 kcal mol^{-1} niže u odnosu na barijere u plinskoj fazi, što predstavlja ubrzanje reakcije za oko 9 redova veličine. Također, standardne Gibbsove energije reakcije u plinskoj fazi su izrazito endergone za oba supstrata (~25 kcal mol^{-1}) dok je u vodi reakcija blago endergona za oba supstrata (~ 3 kcal mol^{-1}). Zanimljivo je da je u vodenoj otopini promijenjen redoslijed barijera u odnosu na plinsku fazu. Reakcija sa **HIS** ima 0,88 kcal mol^{-1} nižu barijeru od reakcije s **NMH** (Slika 30, Tablica 7). Ovaj trend je objašnjen činjenicom da je **HIS** bolje solvatiran molekulama vode u odnosu na **NMH**, čija metilna skupina negativno utječe na solvataciju te lošija solvatacija **NMH** u prijelaznoj strukturi rezultira većom barijerom. Analiza trajektorija dobivenih u EVB simulacijama pokazala je kako **HIS** u prosjeku ima dvije molekule vode više u svojoj neposrednoj blizini u odnosu na **NMH** tijekom reakcije oksidacije (Slika 31).

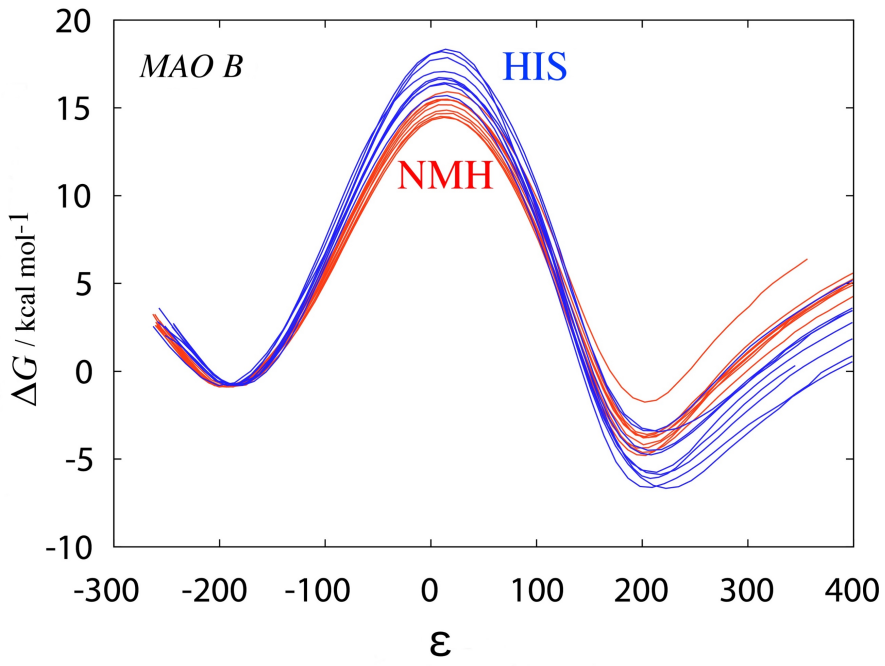


Slika 31. Prosječan broj voda u radijusu od 7 Å oko α-ugljika histamina i *N*-metilhistamina izračunat tijekom EVB simulacija reakcija oksidacije histamina i *N*-metilhistamina u vodi.

Nakon reakcije u vodi, oksidacija *N*-metilhistamina i histamina simulirana je u enzimu gdje se očekuje dodatno sniženje barijera u odnosu na barijere izračunate u vodi. Zaista, izračunate standardne Gibbsove energije aktivacije za reakciju s histaminom i *N*-metilhistaminom su za oko 5 kcal mol^{-1} niže od onih u vodi (Slika 32) Barijera izračunata za reakciju s **NMH** uprosječena je preko 10 simulacijskih replika i iznosi 16,00 kcal mol^{-1}, dok za **HIS** iznosi 17,84 kcal mol^{-1} (Tablica 7).

Tablica 7. Standardne Gibbsove energije aktivacije i standardne devijacije za prijenos hidrida u reakciji oksidacije histamina i *N*-metilhistamina, u plinskoj fazi, vodi i enzimu dobivene iz EVB simulacija. Sve vrijednosti su dane u kcal mol^{-1}.

Supstrat	**Plinska faza**		**voda**		**MAO B**		**Eksperiment**
	$\Delta^{\ddagger}G^{o}$	$\sigma^{\ddagger}$	$\Delta^{\ddagger}G^{o}$	$\sigma^{\ddagger}$	$\Delta^{\ddagger}G^{o}$	$\sigma^{\ddagger}$	$\Delta^{\ddagger}G^{o}$
HHS	33,5	0,2	20,9	0,3	17,8	0,9	19,3
NMH	32,5	0,5	21,8	0,1	16,0	0,5	17,9

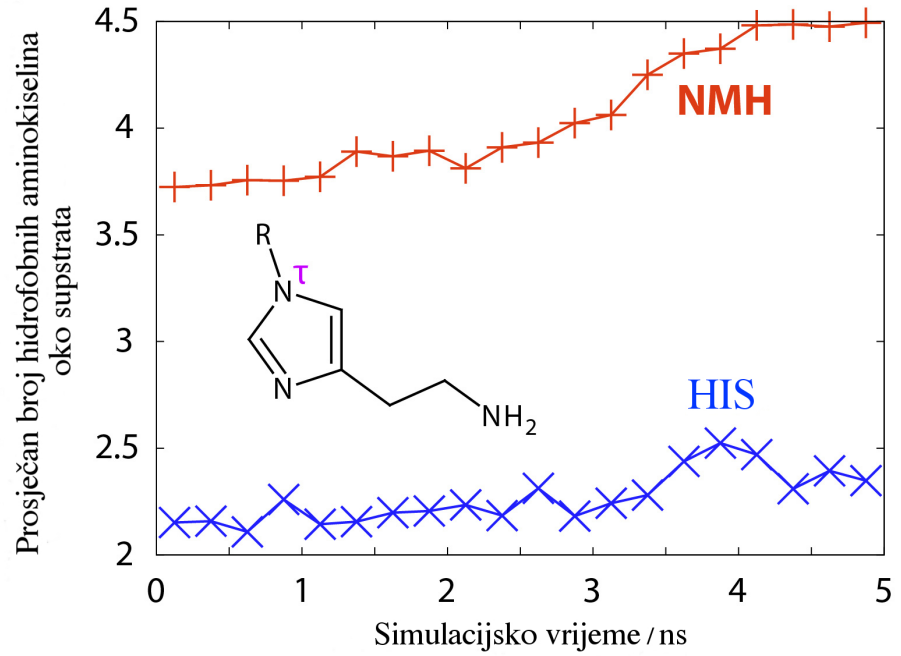


Slika 32. Profili za reakciju oksidacije *N*-metilhistamina i histamina enzimom MAO B dobiveni u EVB simulacijama.

Za razliku od reakcije u vodi, barijera za oksidaciju **NMH** enzimom MAO B niža je u odnosu na barijeru oksidacije **HIS**, što je u potpunom skladu s eksperimentalnim rezultatima. Pored slaganja s eksperimentalno dobivenim vrijednostima, EVB simulacije oksidacije **NMH** i **HIS** su reproducirale i međusobni odnos barijera gdje je izračunata $\Delta\Delta^{\ddagger}G^{o}_{(račun)}$=1,8 kcal mol^{-1} gotovo identična vrijednosti dobivenoj iz eksperimenta $\Delta\Delta^{\ddagger}G^{o}_{(eksp)}$=1,4 kcal mol^{-1}.

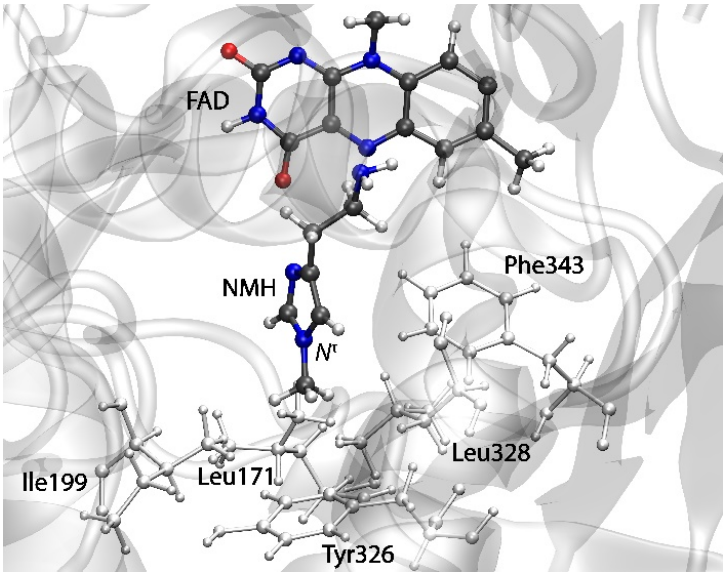
Niža barijera za reakciju oksidacije **NMH** se na prvom mjestu objašnjava manjim brojem molekula vode u aktivnom mjestu enzima tijekom reakcije, gdje je uočeno kako u prosjeku postoji jedna molekula vode manje u usporedbi s reakcijom oksidacije **HIS**. Suprotno od reakcije u vodi, u aktivnom mjestu enzima lošija solvatacija, odnosno manji broj molekula vode u aktivnom mjestu enzima u pravilu rezultira povećanim katalitičkim efektom, s obzirom na to da manji broj voda omogućava bolju stabilizaciju prijelaznog stanja aminokiselinama aktivnog mjesta enzima. Na taj način neometano se ostvaruju povoljne interakcije između reaktivnih dijelova strukture supstrata i enzimskog okruženja koje sudjeluje u reakciji. Isti efekt je uočen u nedavnom računalnom istraživanju oksidacije feniletilamina enzimom MAO A koji je homolog ovdje proučavanog enzima MAO B.[172] Zatim, pokazano je kako je tijekom simulacije reakcije, **NMH** bolje pozicioniran u aktivnom mjestu enzima u odnosu na **HIS**, zahvaljujući svojoj metilnoj skupini vezanoj za imidazolni prsten. Izračunato je kako **NMH**

ostvaruje u prosjeku dvije hidrofobne interakcije više s nepolarnim aminokiselinama veznog mjesta od **HIS** (Slika 33).



Slika 33. Prosječan broj hidrofobnih aminokiselina aktivnog mjesta enzima MAO B u radijusu od 5 Å od atoma N^{τ} na supstratu **NMH** odnosno **HIS** tijekom EVB simulacija.

Kao što je prethodno objašnjeno, hidrofobne interakcije ostvarene s **NMH** doprinose njegovom boljem pozicioniraju u aktivnom mjestu enzima te ga pravilno orijentiraju za reakciju oksidacije. Zanimljivo je da prosječni broj hidrofobnih interakcija raste tijekom reakcije (Slika 33). Ovaj efekt je više izražen za reakciju s **NMH**. Izgleda da povećanje broja hidrofobnih interakcija također doprinosi katalitičkom efektu odnosno doprinosi sniženju barijere za reakciju oksidacije. Identificirane hidrofobne interakcije u reakciji enzimski katalizirane oksidacije **NMH** prikazane su na Slici 34.

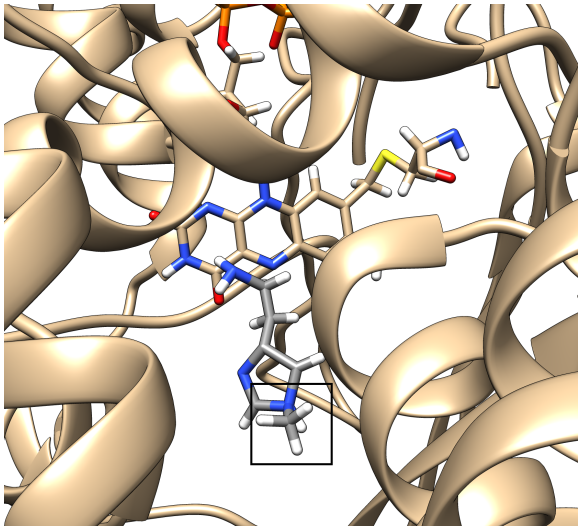


Slika 34. Prikaz *N*-metilhistamina u aktivnom mjestu enzima MAO B tijekom simulirane reakcije oksidacije s prikazanim nepolarnim aminokiselinama.

4.2.3.1. Priprema sustava za EVB simulacije

EVB simulacije podrazumijevaju niz klasičnih simulacija koje se temelje na konceptu polja sila parametriziranog za dva stanja, stanje reaktanata i stanje produkta. Reaktanti su predstavljeni neutralnim susptratom (**NMH** ili **HIS**), dok je produkt podrazumijevao prenešeni vodik s α-ugljika supstrata na atom N5 kofaktora FAD, što je rezultiralo pozitivno nabijenim iminom i anionom kofaktora $FADH^-$. Nakon što su definirani reaktanati (λ_0) i produkti (λ_1), sustav je prevođen u smjeru $\lambda_0 \rightarrow \lambda_1$ pomoću metode perturbacije slobodne energije (engl. *free energy perturbaion*, FEP) koristeći program qdyn5 koji je implementiran u programski paket Q v.5.[126]

Početne strukture za EVB simulacije oksidacije *N*-metilhistamina i histamina enzimom MAO B uzete su iz klasičnih molekulsko-dinamičkih simulacija enzima MAO B u kompleksu s **NMH** pri čemu je MAO B u kompleksu s **HIS** napravljen zamjenom metilne skupine na *N*-metilhistaminu vodikom. Na ovaj način su dobivene dvije apsolutno identične konformacije enzima, kofaktora i supstrata pri čemu je jedina razlika bila prisutnost metilne skupine na supstratu **NMH**, odnosno vodika na **HIS**. Ovo je omogućilo proučavanje enzimski katalizirane reakcije koja nije afektirana početnim različitim konformacijama enzima, supstrata i kofaktora (Slika 35).



Slika 35. Preklopljene početne strukture kompleksa MAO B + **NMH** i MAO B + **HIS** koje su korištene u EVB simulacijama. Strukture kompleksa potpuno su identične, a jedina razlika potječe od strukture supstrata koji ima metilnu skupinu (**NMH)**, odnosno vodik (**HIS)** što je označeno crnim kvadratom.

Napravljeni modeli su podrazumijevali jednu podjedinicu enzima MAO B u kompleksu s **NMH** odnosno **HIS**. Zatim je konstruirana simulacijska sfera s radijusom od 30 Å koja je centrirana na reaktivnom atomu N5 kofaktora FAD koja je sadržavala 1687 molekula vode. Za simulacije je korišteno polje sila OPLS-AA[173] te model vode TIP3P. Parametri za kofaktor FAD kovalentno vezan za Cys397 preuzeti su iz prethodnih istraživanja,[35] dok su parametri za reaktante i produkte generirani *de novo*. Ekvilibracija sustava iznosila je 2,2 ns, nakon čega su uslijedile FEP simulacije u kojima se sustav prevodio u smjeru $\lambda_0 \rightarrow \lambda_1$. Protokol za FEP simulacije sastojao se iz 51 koraka kojim se sustav postepeno prevodio iz stanja reaktanata λ_0 u stanje produkta λ_1. Trajanje svakog koraka je bilo 100 ps, što ukupno daje 5,1 ns duge simulacije oksidacije svakog od supstrata. Kako bi se poboljšalo uzorkovanje duž reakcijskog puta, FEP simulacije su napravljene u 10 replika za svaki supstrat. Krajnji rezultat je dan kao uprosječena vrijednost dobivena iz 10 replika simulacije iste reakcije. Kako bi se izbjegli nekonvergirani profili slobodne energije koji su povezani s ograničenom dužinom simuliranja, [174] primijenjena je blaga pozicijska sila od 0,5 kcal $(\text{molÅ}^2)^{-1}$ na reaktivne atome. Ovaj pristup se koristi u sličnim istraživanjima.[35,149,172]

EVB profili se dobivaju u *a posteriori* analizi podataka dobivenih iz FEP simulacija. U tu svrhu koristio se program qfep5 koji je dio programskog paketa Q v.5. EVB parametri koji su se koristili u dobivanju EVB profila za reakciju u vodi te za MAO B kataliziranu reakciju oksidacije **NMH** i **HIS** dobiveni su iz FEP simulacija iste reakcije koja je prethodno provedena u plinskoj fazi, a čije su standardne Gibbsove energije aktivacije i reakcije usuglašene sa standardnim Gibsovim energijama aktivacije i reakcije za referentnu reakciju u plinskoj fazi koje su izračunate na razini teorije M06-2X/6-31+G(d,p).

4.3. Diamin-oksidaza

U drugom metaboličkom putu razgradnje histamina u tijelu sudjeluje enzim diamin-oksidaza (DAO). Za razliku od enzima MAO B koji je aktivan *in vivo* na metiliranoj formi histamina, *N*-metilhistaminu, enzim DAO razgrađuje jednako efikasno histami i *N*-metilhistamin (Tablica 1). Fiziološki značaj jednake aktivnosti enzima DAO prema histaminu i *N*-metilhistaminu ogleda se u tome što uklanjajući višak *N*-metilhistamina, enzim DAO omogućava neometano funkcioniranje drugog histaminskog metaboličkog puta. Naime, *N*-metilhistamin nastaje u reakciji metiliranja histamina koju katalizira enzim histamin-*N*-metiltransferaza, koja pokazuje inhibiciju produktom reakcije koju katalizira (*N*-metilhistaminom).[60] Ovakav proces spada u inhibiciju povratne sprege te predstavlja način reguliranja mnogih metaboličkih putova. Stoga, sposobnost enzima DAO da jednako dobro razgrađuje histamin i *N*-metilhistamin postavlja ovaj enzim na centralno mjesto u katabolizmu histamina.

S obzirom na to da enzim DAO jednako dobro razgrađuje oba supstrata (vidjeti Tablicu 1) u ovom dijelu doktorske disertacije proučit će se katalitički mehanizam enzima DAO na primjeru njegovog primarnog supstrata histamina primjenom pristupa QM-klaster i simulacija EVB.

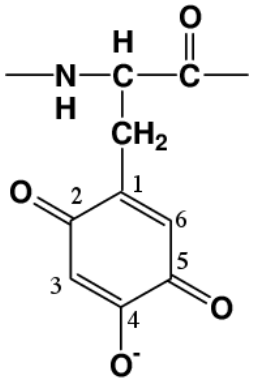
4.3.1. Kvantno-mehanički računi na modelu enzima diamin-oksidaze

Struktura enzima DAO u kompleksu s inhibitorom aminogvanidinom (PDB kod 3MPH) rezolucije 2.05 Å[175] preuzeta je iz baze podataka PDB. Aminokiseline koje nedostaju u strukturi izgrađene su korištenjem servera I-TASSER. Koordinate inhibitora poslužile su kao referentna točka za izgradnju supstrata histamina koji je modeliran kao nenabijeni spoj jer je eksperimentalno pokazano da se histamin veže u aktivnom mjestu enzima kao kation, međutim mora biti deprotoniran kako bi ušao u reakciju.[176] Za kofaktor TPQ pokazano je da ima deprotoniranu hidroksilnu skupinu na *para* položaju koja koordinira kation Cu^{2+}. (ref. 177) Kako bi se dobila struktura enzima iz koje će se izgraditi model enzima za kvantno-mehaničke račune u okviru klaster pristupa te kako bi se dobila početna relaksirana struktura cijelog enzima za EVB simulacije, provedene su kratke klasične MD simulacije (5 ns). Za parametrizaciju izgrađenog kompleksa korišteni su polja sila GAFF i ff14SB. U svrhu određivanja parametara te parcijalnih naboja na histaminu te kofaktoru TPQ provedeni su kvantno-mehanički računi, koristeći programski paket Gaussian uz primjenu razine teorije HF/6-31G(d). Početno protonacijsko stanje aminokiselina enzima DAO određeno je pomoću servera PROPKA 3.1, ali i vizualnom provjerom susjedstva onih aminokiselina koje mogu imati različita protonacijska stanja. Svi arginini i lizini bilo su pozitivno (+1), a glutamati i aspartati negativno (-1) nabijeni, kao što se i očekuje pri fiziološkim uvjetima. Kompleks enzima sa supstratom je smješten u centar krnjeg oktaedra ispunjenog molekulama vode TIP3P pri čemu je voda dosezala do udaljenosti od 10 Å od površine kompleksa. Optimizacija geometrije kompleksa i molekulsko-dinamičke simulacije provedene su unutar programa AMBER. Korišteni su periodični rubni uvjeti, a elektrostatske interakcije računate su metodom PME. Kompleks je prvo optimiziran koristeći metode najstrmijeg spusta i konjugiranih gradijenata. Nakon optimiranja sustav je zagrijavan, pri čemu je temperatura linearno povećavana od 0 K do 300 K u uvjetima NVT u periodu od 50 ps. Nakon uravnoteženja, enzim u kompleksu s histaminom simuliran je 5 ns korištenjem uvjeta NPT pri temperaturi od 300 K i tlaku od 1 atm, korištenjem Langevinovog termostata s frekvencijom sudara 1 ps^{-1}. Algoritam SHAKE je korišten za ograničenje vibracija veza u kojima sudjeluju atomi vodika. Nakon završenih MD simulacija odabrane su strukture enzima DAO u kompleksu s HIS iz kojih se napravio model enzima u kompleksu sa supstratom za mehanističke kvantno-mehaničke račune te za EVB simulacije.

Model enzima za mehanističke kvantno-mehaničke račune sastojao se iz kofaktora TPQ, nenabijenog histamina, aminokiselina Tyr371, Tyr459, Trp376, Asp373, zatim kationa Cu^{2+} te aminokiselina koji čine njegovu primarnu koordinacijsku sferu His510, His512 i

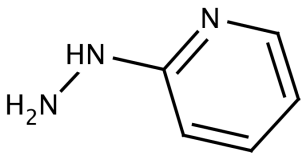
His675. Kofaktor TPQ kao i aminokiseline modela enzima odsječeni su na njihovim α-C atomima koji su zadržani u formi metilne skupine. Za razliku od QM računa provedenih na modelu enzima MAO B, nije primijenjena sila kako bi se pozicije α-C atoma držale "zamrznutima" već je svim atomima u strukturi modela enzima dozvoljeno da se slobodno optimiraju. Kako bi smanjili grešku pri odabiru početne konformacije modela enzima u kompleksu sa supstratom odabrano je nekoliko početnih struktura iz MD simulacija, a u mehanistička ispitivanja se krenulo s najstabilnijom konformacijom enzima u kompleksu s histaminom. Sve geometrije su optimirane koristeći razinu teorije M11L/6–31G(d)-SDD pri čemu su termalne korekcije za standardnu Gibbsovu energiju aktivacije i reakcije dobivene odgovarajućim frekvencijskim računima. Funkcional M11L odabran je zato što dobro opisuje energiju interakcija između kompleksa kationa raznih metala i imidazola, što je upravo slučaj u proučavanom modelu enzima, s obzirom na to da je kation Cu^{2+} koordiniran s tri histidina koji imaju imidazole u bočnom ogranku.[178] Konačne *single point* energije (računi energije na fiksnoj geometriji) su dobivene koristeći 6-311++G(2df,2pd)-SDD osnovni skup, uz primjenu funkcionala M11L, M06 i PBE0. M11L je rezultirao najboljim slaganjem s eksperimentalnom vrijednosti, zbog čega su rezultati dobiveni korištenjem funkcionala M11L diskutirani kroz tekst koji slijedi. Vrijednosti za energije dobivene upotrebom preostalih funkcionala dane su u Tablici S2 u poglavlju 8. te se mogu usporediti s vrijednostima diskutiranim ovdje. Kako bi se uzeli u obzir polarizacijski efekti prouzročeni ostatkom enzima tijekom svih QM računa korišten je CPCM implicitni polarizacijski model otapala s dielektričnom konstantom $\varepsilon = 4$, dok su preostali parametri odgovarali čistoj vodi. Sve navedeno je rezultiralo razinom teorije (CPCM)/M11L/6–311++G(2df,2pd)-SDD//(CPCM)/M11L/6–31G(d)-SDD.

Prvi mehanizam koji je ispitan bio je mehanizam opisan u literaturi, a koji podrazumijeva stvaranje Schiffove baze koja nastaje u reakciji dušika iz amino skupine histamina i atoma C5 u susjedstvu deprotonirane hidroksilne skupine na *para* položaju kofaktora TPQ (Slika 36).



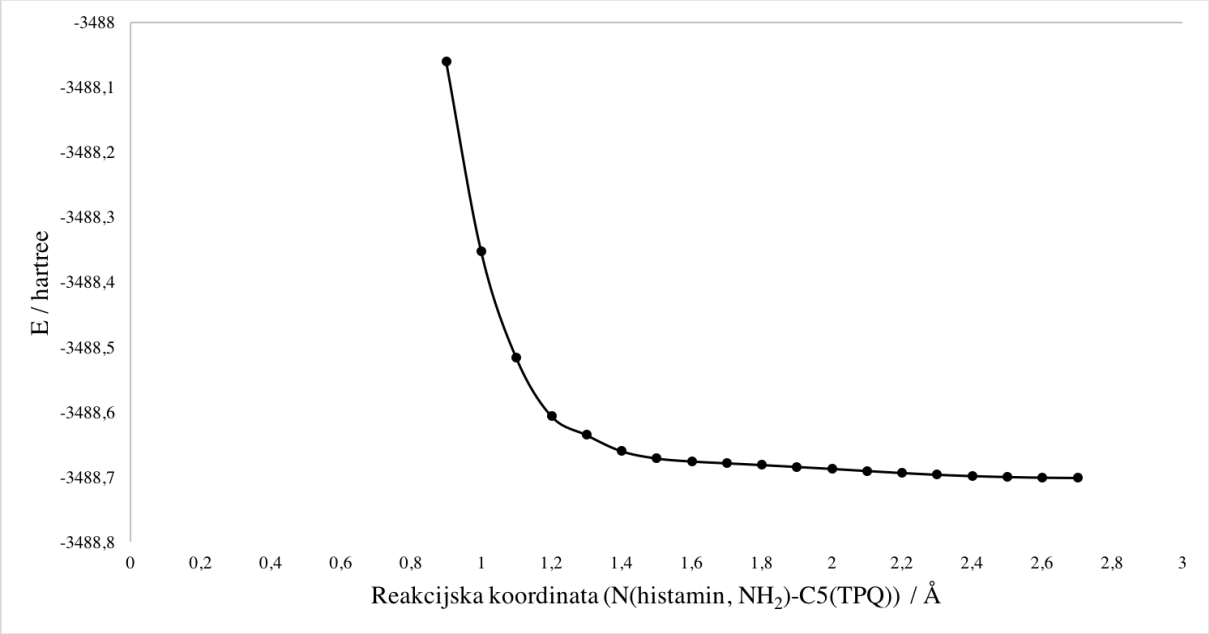
Slika 36. Kofaktor TPQ enzima DAO nastao posttranslacijskom modifikacijim očuvanog tirozina.

Ovaj mehanizam poredložen je na temelju kristalne sturkture enzima DAO s kovalentnim inhibitorom 2-hidrazinopiridinom (Shema 4) te na temelju spektroskopskih analiza provedenih na modelnim spojevima (*para* supstituiranim benzilaminima).



Shema 4. Struktura kovalentnog inhibitora enzima DAO koji tvori Schifforvu bazu s kofaktorom TPQ.

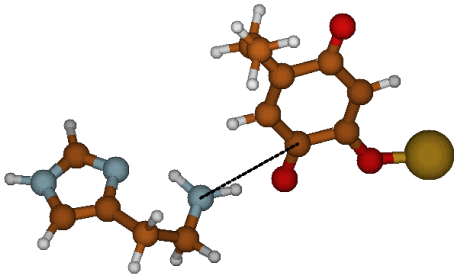
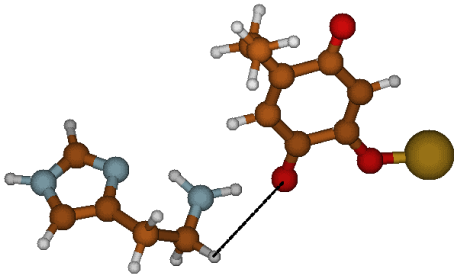
Međutim, dana procedura skeniranja plohe potencijalne enegije za reakciju modeliranu prema mehanizmu koji uključuje nastajanje Schiffove baze u okviru QM-klaster pristupa nije rezultirala stabilnim aduktom već je energija sustava kontinuirano rasla (Slika 37).



Slika 37. Stvaranje Schiffove baze u reakciji između dušika iz amino skupine histamina i atoma C5 iz karbonila kofaktora TPQ primjenom metode QM-kaster.

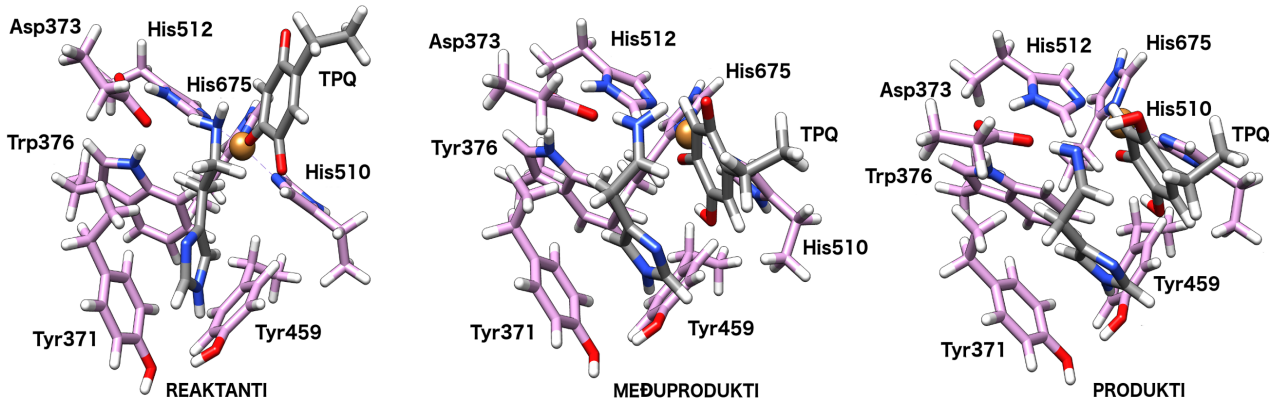
Sljedeći mehanizam koji je ispitan bio je mehanizam koji podrazumijeva direktni prijenos hidrida sa supstrata na kofaktor. Opravdanje za ispitivanje ovog mhanizma pronađeno je u analogiji s mehanizmom enzima MAO B,[34,35,153] s obzirom na to da oba enzima, MAO B i DAO, kataliziraju reakciju istog tipa, a to je oksidativna deaminacija amina. Pored toga u literaturi je opisan i direktni prijenos hidrida s α-ugljika donora na kisik iz karbonila kinona.[179] Zbog svega navedenog modelirana je reakcija direktnog prijenosa hidrida sa α-ugljika histamina na atom O5 iz karbonilne skupine kofaktora TPQ primjenom metode QM-klaster. Ispitivanje oba mehanizma grafički je prikazano u Tablici 8.

Tablica 8. Ispitivanje katalitičkog mehanizma enzima DAO primjenom metode QM-klaster.

Mehanizam koji uključuje stvaranje Schiffove baze	**Hidridni mehanizam**
	

Zbog preglednosti slike prikazani su samo supstrat histamin, kofaktor TPQ i kation Cu^{2+}, dok su ostale aminokiseline iz modela enzima zanemarene. Cu^{2+} prikazan je žutom bojom, dušici su prikazani svijetloplavom bojom, dok su kisici prikazani crvenom.

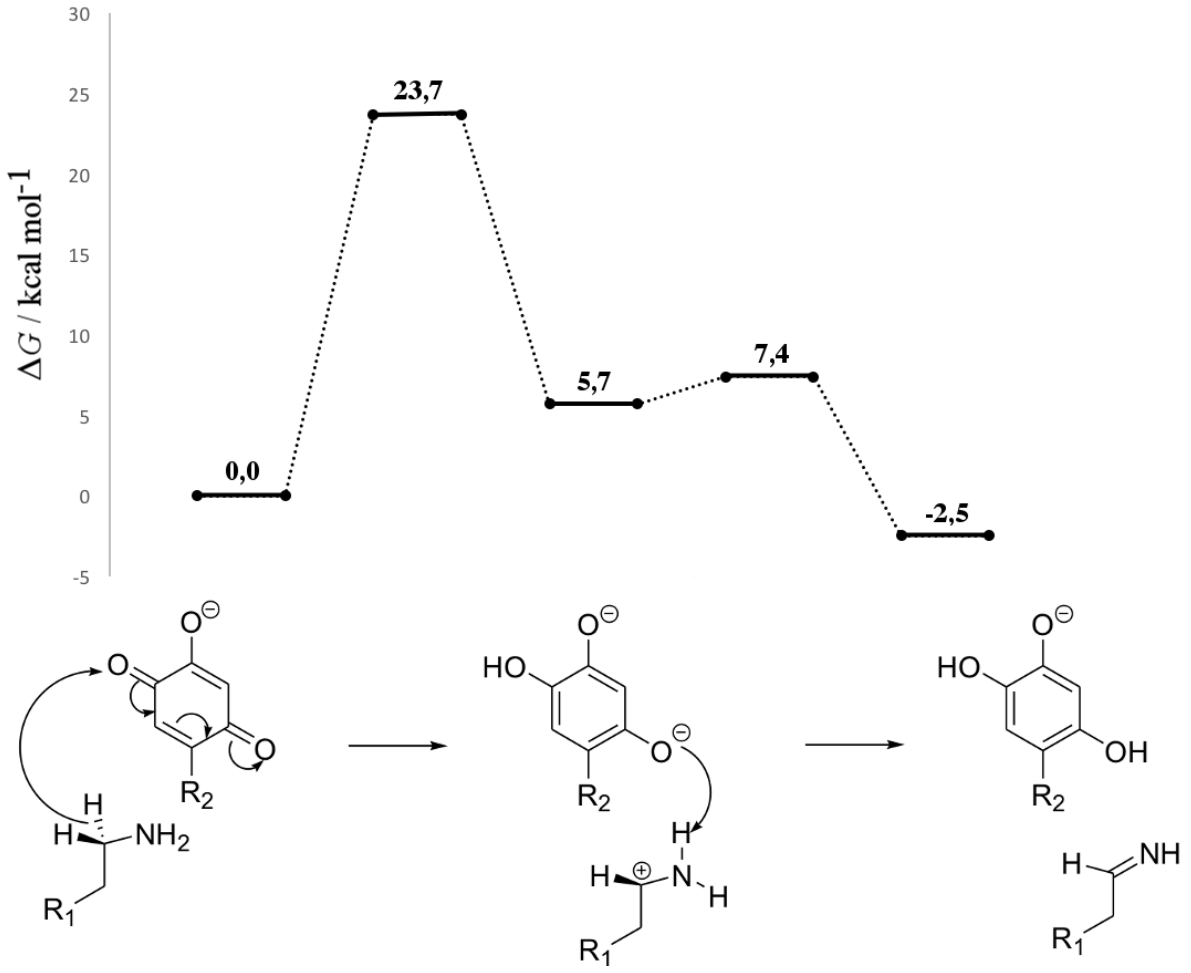
Skeniranje plohe potencijalne enegije za reakciju modeliranu prema hidridnom mehanizmu rezultiralo je stacionarnim točkama koje su prikazane na Slici 38.



Slika 38. Strukture relevantnih stacionarnih točaka za reakciju oksidacije histamina enzimom DAO prema mehanizmu koji podrazumijeva prijenos hidrida.

U reaktantima, supstrat histamin je stabiliziran i orijentiran za reakciju mrežom vodikovih veza. Amino skupina histamina ostvaruje vodikovu vezu s karboksilnom skupinom u bočnom ogranku Asp373 koja iznosi 2,151 Å. Zatim, imino skupina iz imidazola histamina ostvaruje kontakt s kisikom iz hidroksilne skupine Tyr459, a dana udaljenost iznosi 2,134 Å. Udaljenost između reaktivnog vodika vezanog za α-ugljik histamina i kisika iz karbonilne skupine na TPQ kofaktoru iznosi 2,578 Å. S druge strane, Asp373 ostvaruje vodikove veze s indolnom skupinom Trp376 (1,802 Å) te s imino skupinom iz imidazola His512 (1,660 Å).

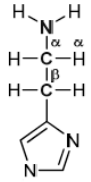
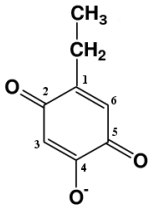
Direktni prijenos hidrida s α-ugljika moguć je i u slučaju reakcije razgradnje histamina katalizirane enzimom DAO (Slika 39), što je u suglasnosti s prijašnjim rezultatima provedenim na enzimu MAO B u kompleksu s dopaminom i noradernalinom te s *N*-metilhistaminom. U prijelaznoj strukturi, vodik koji se prenosi nalazi se između α-ugljika na supstratu i atoma O5 karbonila kofaktora TPQ i te udaljenosti iznose 1,441 Å i 1,114 Å. Standardna Gibbsova energija aktivacije za proces prijenosa hidrida iznosi 23,7 kcal mol^{-1} (ν_{imag} = 1012*i* cm^{-1}). Mreža vodikovih veza se očuvala i u prijelaznoj strukturi. Amino skupina histamina i dalje ostvaruje vodikovu vezu s karboksilnom skupinom u bočnom ogranku Asp373 koja je u prijelaznoj strukturi kraća i iznosi 1,810 Å. Imino skupina iz imidazola supstrata ostala je u kontaktu s kisikom iz hidroksilne skupine Tyr459, međutim veza je u prijelaznoj strukturi kraća i iznosi 1,975 Å. Asp373 i dalje ostvaruje vodikove veze s indolnom skupinom Trp376 (1,812 Å) te s imino skupinom iz imidazola His512 (1,738 Å).



Slika 39. Profil za reakciju oksidativne deaminacije histamina katalizirane enzimom DAO u okviru pristupa QM-klaster. Zbog preglednosti prikazane su samo one vrste koje direktno sudjeluju u reakciji.

Iz analize atomskih naboja (Tablica 9) vidi se da je ovaj proces povezan s prijenosom hidridnog aniona (H^-) s histamina na atom O5 kofaktora TPQ. U reaktantima, ukupni naboji na supstratu HIS i kofaktoru TPQ su 0,02 i -1,02, koji se zatim mijenjaju te u prijelaznoj strukturi iznose 0,25 i -1,25. Ovo upućuje na to da tijekom reakcije HIS gubi jednu četvrtinu elektrona koji se zatim akomodira na kofaktoru TPQ. Zatim, naboj na kisiku O5 kofaktora TPQ mijenja se od -0,60 u reaktantima do -0,70 u prijelaznoj strukturi što pokazuje elektrofilnu prirodu atoma O5. Naboj na α-ugljiku supstrata, s kog se prenosi hidridni anion H^-, mijenja se od 0,22 do 0,43 u prijelaznoj strukturi. Naboj na amino dušiku se reducira, od -0.96 do -0,80 što je praćeno skraćenjem veze N(amino skupina)-C(α), koja se mijenja od 1,441 Å u reaktantima, dok u prijelaznoj strukturi iznosi 1,340 Å, što je u suglasnosti s predloženim prijenosom hidrida.

Tablica 9. Preraspodjela naboja tijekom prijenosa hidrida kataliziranog enzimom DAO izračunata primjenom analize NBO na razini teorije (CPCM)/M11L/6–31G(d)-SDD.

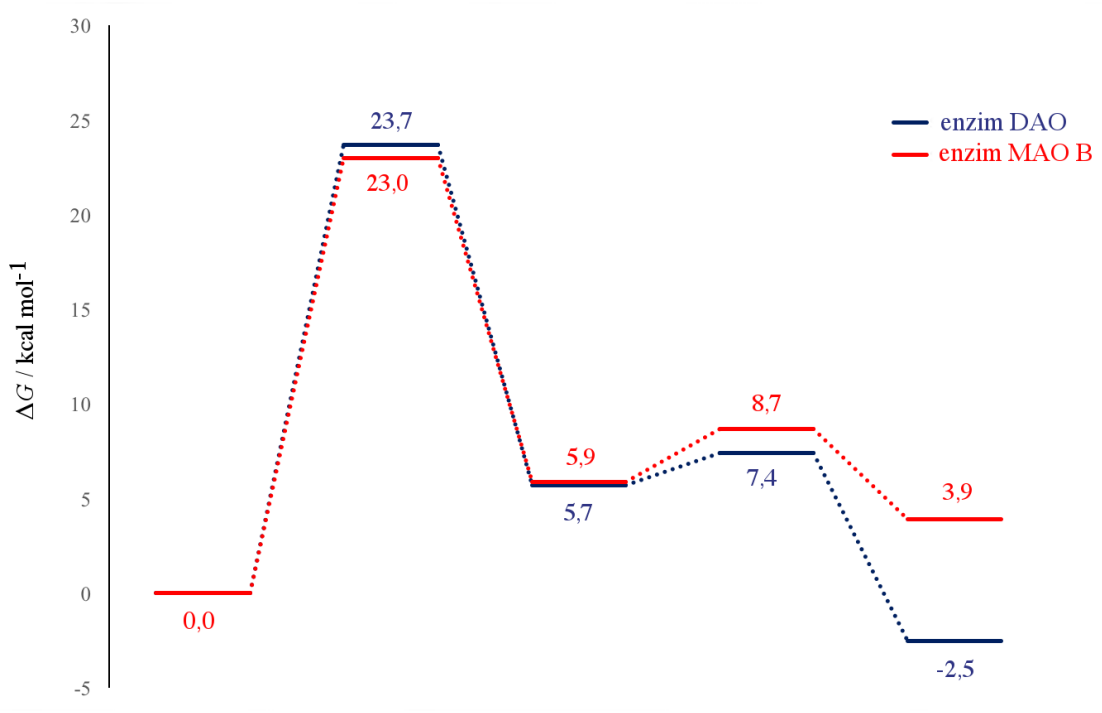
Sistem	Atom/Molekula	Izolirani spoj	Reaktanti	TS	Međuprodukt
	N(amino)	-0,97	-0,96	-0,80	-0,73
	α–H	0,22	0,22	0,43	0,52
	α–C	-0,23	-0,23	-0,13	0,28
	β–C	-0,52	-0,52	-0,52	-0,57
	histamin	0,00	0,02	0,25	0,80
	C5	0,54	0,57	0,32	0,27
	O5	-0,60	-0,60	-0,70	-0,77
	C2	0,51	0,55	0,51	0,41
	O2	-0,70	-0,65	-0,72	-0,85
	TPQ	-1,00	-1,02	-1,25	-1,40

Nakon inicijalnog prijenosa hidrida proučavani sustav se relaksira do međuprodukta (Slike 36 i 37), koji se karakterizira polureduciranim anionskim kofaktorom TPQ te pozitivno nabijenim iminom. Supstrat histamin se postavio gotovo simetrično svojom amino skupinom između karboksilne skupine Asp373 i atoma O2 iz karbonila na kofaktoru TPQ (Slika 36). Ostvarene vodikove veze redom iznose 1,682 Å i 1,639 Å. Imino skupina histamina je i dalje u kontaktu s kisikom iz hidroksilne skupine Tyr459 (1,976 Å). Asp373 ostvaruje vodikove veze s indolnom skupinom iz Trp376 (1,872 Å) te s imino skupinom iz imidazola His512 (1,863 Å). Prenešeni

vodik na kofaktor TPQ orijentirao se prema kisiku iz deprotonirane hidroksilne skupine u *para* položaju (Slika 36) i duljina vodikove veze iznosi 1,945 Å.

Sljedeći korak u oksidaciji histamina uključuje deprotoniranje amino skupine supstrata. Iz strukture međuprodukta jasno se vidi kako je amino skupina histamina idealno pozicionirana prema kisiku O2 iz karbonila kofaktora TPQ. Stoga, sljedeći korak u reakciji podrazumijevao je prijenos protona iz amino skupine histamina na atom O2 kofaktora TPQ. Ovdje je bitno spomenuti da je kod enzima MAO B ovaj korak potpomognut s dvije molekule vode s obzirom na prostornu udaljenost amino skupine iz međuprodukta i atoma N1 kofaktora FAD koji prima vodik iz amino skupine supstrata. Kao što se može vidjeti iz profila za reakciju (Slika 39) ovaj proces je praćen niskom barijerom od svega 1,7 kcal mol^{-1}. U prijelaznoj strukturi, vodik iz amino skupine se nalazi između dušika iz amino skupine supstrata i atoma O2 kofaktora TPQ i te udaljenosti iznose 1,166 Å i 1,318 Å. Barijera za proces deprotoniranja iznosi 1,7 kcal mol^{-1} (ν_{imag} = 1056*i* cm^{-1}). Mreža vodikovih veza se očuvala i u ovoj prijelaznoj strukturi. Amino skupina histamina i dalje ostvaruje vodikovu vezu s karboksilnom skupinom u bočnom ogranku Asp373 koja iznosi 1,774 Å. Imino skupina iz imidazola histamina ostala je u kontaktu s kisikom iz hidroksilne skupine Tyr459 i ta veza iznosi 1,967 Å. Asp373 orijentiran je i dalje vodikovim vezama koje ostvaruje s indolnom skupinom Trp376 (1,831 Å) te s imino skupinom imidazola His512 (1,827 Å). Barijera za deprotoniranje amino skupine znatno je niža od barijere za prijenos hidrida, što sugerira da je prijenos hidrida i u slučaju enzima DAO korak koji određuje brzinu sveukupne reakcije (engl. *rate limiting step*). Nakon deprotoniranja, sustav se stabilizira za 7,9 kcal mol^{-1} što čini cijelu reakciju egzergonom odnosno izvedivom (Slika 39). Reakcija oksidativne deaminacije histamina rezultira neutralnim iminom i reduciranim kofaktorom TPQ kao finalnim produktima (Slika 38).

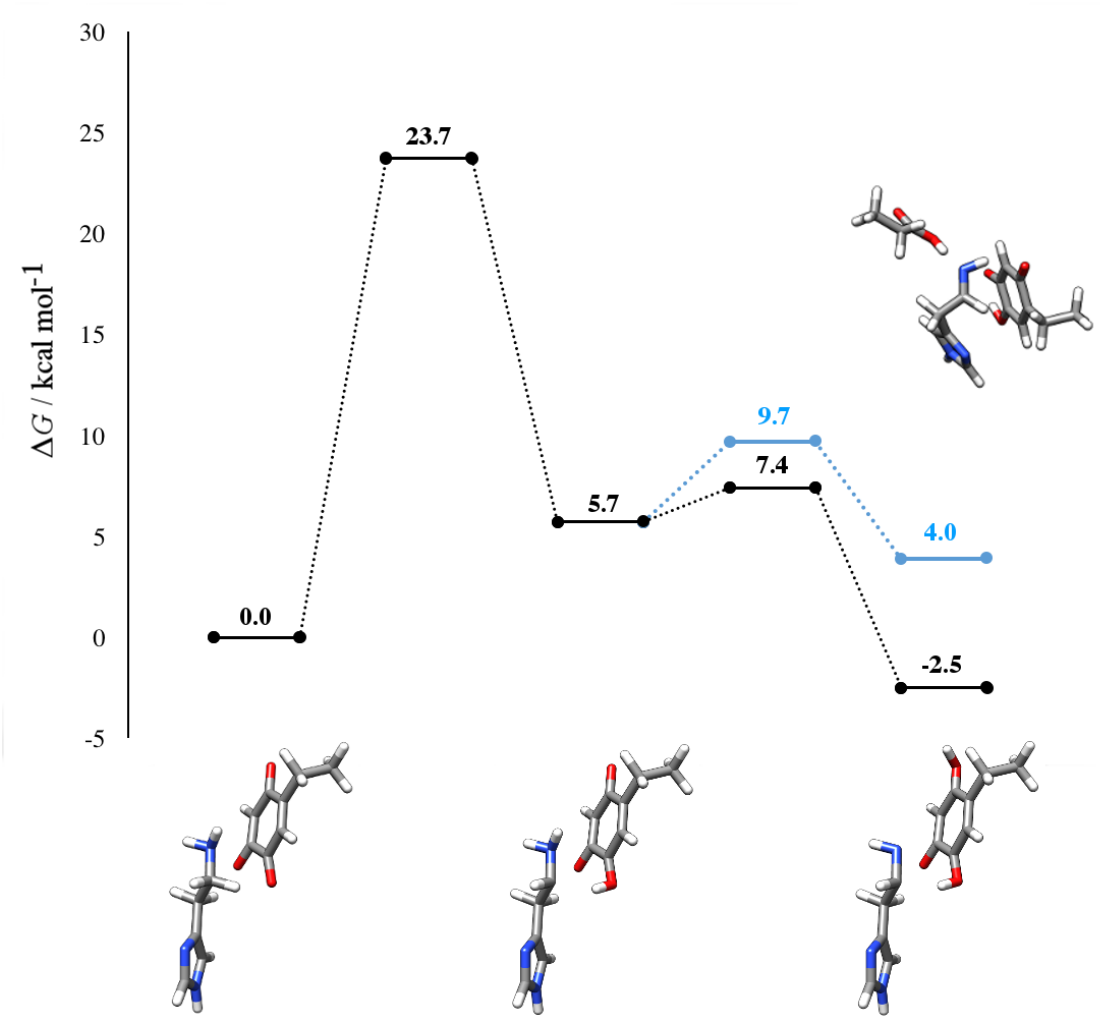
Zanimljivo je kako profili za reakciju oksidativne deaminacije histamina enzimima DAO i MAO B gotovo identično izgledaju (Slika 40). Glavna razlika potječe od standardne Gibsove energije reakcije. Reakcija katalizirana enzimom MAO B je endergona ($\Delta_r G^o$ = 3,9 kcal mol^{-1}), dok je reakcija oksidacije histamina katalizirana enzimom DAO egzergona ($\Delta_r G^o$ = -2,5 kcal mol^{-1}), što podupire činjenicu da se histamin u tijelu direktno oksidira enzimom DAO, dok MAO B ne katalizira direktnu razgradnju histamina već on mora biti prethodno metiliran do *N*-metilhistamina.



Slika 40. Profili za reakciju oksidativne deaminacije histamina katalizirane enzimima DAO i MAO B dobiveni primjenom pristupa QM-klaster.

U sljedećem koraku, provjerena je i druga mogućnost prijenosa protona sa supstrata u međuproduktima na karboksilnu skupinu iz bočnog ogranka Asp373 enzima, umjesto na atom O2 kofaktora TPQ (Slika 41). I za ovaj korak je dobivena prijelazna struktura, međutim standardna Gibsova energija aktivacije za takav proces prijenosa protona iznosi 4,0 kcal mol^{-1} (ν_{imag} = 591*i* cm^{-1}), što je 2,3 kcal mol^{-1} više od energije potrebne za prijenos protona na atom O2 kofaktora TPQ. Nakon prijenosa protona, sustav se stabilizira za 5,7 kcal mol^{-1} što rezultira endergonim profilom reakcije ($\Delta_r G^o$ = 4,0 kcal mol^{-1}). Ovo sugerira da u drugom koraku reakcije, kada dolazi do deprotoniranja amino skupine supstrata, sudjeluje atom O2 kofaktora TPQ, a ne karboksilna skupina iz bočnog ogranka Asp373 (Slika 41).

Primijenjena metoda QM-klaster rezultirala je barijerom od $\Delta^{\ddagger}G^{o}_{(izračunata)}$ = 23,7 kcal mol^{-1}, što je u relativno dobrom slaganju s eksperimentalno dobivenom vrijednosti, $\Delta^{\ddagger}G^{o}_{(eksp.)}$=17,0 kcal mol^{-1}. U sljedećem koraku, uzet je u obzir ostatak strukture enzima te se ispitao njezin efekt na katalizu primjenom EVB simulacija.



Slika 41. Profil za reakciju oksidativne deaminacije histamina koja je katalizirana enzimom DAO u okviru QM-klaster pristupa s ispitanim alternativnim prijenosom protona iz amino skupine histamina na kisik karboksilne skupine iz bočnog ogranka Asp373 u drugom koraku reakcije. Zbog preglednosti slike prikazane su samo one vrste koje direktno sudjeluju u reakciji.

4.3.2. EVB simulacije reakcije oksidacije histamina katalizirane enzimom DAO

Na modelu enzima, primjenom pristupa QM-klaster, pokazan je mehanizam oksidacije histamina enzimom DAO koji uključuje prijenos hidrida u koraku koji određuje brzinu reakcije. Međutim, u svrhu modeliranja referentne reakcije za simulacije EVB, ponovo je ispitana mogućnost mehanizma koji uključuje stvaranje Schiffove baze, u reakciji između dušika iz amino skupine histamina i atoma C5 na kofaktoru TPQ. Reakcija je podrazumijevala (i) samo supstrat i kofaktor, te (ii) supstrat, kofaktor i kation Cu^{2+} koji je koordiniran za deprotoniranu hidroksilnu skupinu u *para* položaju kofaktora TPQ (Tablica 8). Oba mehanistička računa provedena su u plinskoj fazi, a zatim i u implicitno prikazanoj vodenoj otopini koja je modelirana primjenom modela otapala CPCM. Reakcija modelirana po Schiffovom mehanizmu u svim slučajevima rezultirala je kontinuiranim porastom energije uz pucanje kinonskog prstena pri formiranju veze između dušika iz amino skupine histamina i atoma C5 kofaktora TPQ na 1,3 Å. Stoga, uzevši u obzir rezultate dobivene primjenom metode QM-klaster na modelu enzima te račune provedene između histamina i kofaktora TPQ, odnosno histamina, TPQ i kationa Cu^{2+}, mehanizam koji uključuje stvaranje Schiffove baze je definitivno odbačen. Referentna reakcija za reakciju oksidacije histamina zbog toga je modelirana prema mehanizmu prijenosa hidrida sa α-ugljika histamina na atom O5 modela kofaktora TPQ u plinskoj fazi, primjenom razine teorije B3PW91/6-31G(d). Nakon toga je parametriziran Hamiltonijan EVB kako bi reproducirao dobivene $\Delta^{\ddagger}G^{o}_{plin}$ i $\Delta_r G^{o}_{plin}$ vrijednosti za reakciju modeliranu prema hidridnom mehanizmu. Izračunate $\Delta^{\ddagger}G^{o}_{plin}$ i $\Delta_r G^{o}_{plin}$ za reakciju prijenosa hidrida s histamina na kofaktor TPQ kao i odgovarajući kalibrirani EVB parametri prikazani su u Tablici 10. Nakon toga reakcija je simulirana u vodenoj otopini i enzimu DAO, a vrijednosti za $\Delta^{\ddagger}G^{o}$ i i $\Delta_r G^{o}$ za reakciju u vodenoj otopini i enzimu dobivene su koristeći prethodno izračunate EVB parametre za reakciju koja je provedena u plinskoj fazi.

Tablica 10. Izračunate standardne Gibbsove energije aktivacije i reakcije za prijenos hidrida u reakciji oksidacije histamina kofaktorom TPQ u plinskoj fazi te parametri EVB koji su izračunati primjenom FEP simulacija iste reakciju u plinskoj fazi usuglašavanjem s danim vrijednostima DFT.

Funkcional/Osnovni skup	**DFT izračun**		**Kalibrirani EVB parametri**	
	$\Delta^{\ddagger}G^{o}$ / kcal mol^{-1}	$\Delta_r G^{o}$ / kcal mol^{-1}	H_{12} / kcal mol^{-1}	$\alpha_2{}^0$ / kcal mol^{-1}
B3PW91/6-31G(d)	54,8	54,0	98,8	204,9

Kako bi se modelirao prijenos hidrida metodom EVB, standardna Gibbsova energija aktivacije ($\Delta^{\ddagger}G^{o}_{\text{plin}}$) i reakcije ($\Delta_{\text{r}}G^{o}_{\text{plin}}$) za referentnu reakciju u plinskoj fazi moraju biti poznate. Prijelazna struktura za danu reakciju u plinskoj fazi potvrđena je frekvencijskom analizom te računima IRC kako bi se dobili odgovarajući reaktanti, odnosno produkti, koje spaja dana sedlasta točka. Navedeni računi provedeni su u programu Gaussian09.[125] Svrha računa u plinskoj fazi je računanje standardne Gibbsove energije aktivacije i reakcije kako bi se kalibrirali EVB parametri, a to su engl. *coupling term* (H_{12}) u EVB Hamiltonijanu i pomak ($\alpha_2{}^0$) u potencijalnoj energiji između reaktanta i produkta pri čemu se izračunati EVB parametri (Tablica 10) neizmijenjeni dalje koriste u simuliranju iste reakcije, ali u drugoj sredini, bilo da je riječ o reakciji u vodi ili o reakciji u enzimu.

Početna struktura za EVB simulacije oksidacije histamina pomoću enzima DAO uzeta je iz kratke (5 ns) klasične molekulsko-dinamičke simulacije enzima DAO u kompleksu s HIS. Napravljeni model podrazumijevao je jednu podjedinicu enzima DAO u kompleksu s HIS. Zatim je konstruirana simulacijska sfera s radijusom od 30 Å koja je centrirana na reaktivnom α-ugljiku histamina. Atomi izvan ove sfere su fiksirani primjenom blage sile te su zadržali originalnu poziciju. Za simulacije je korišteno polje sila OPLS-AA te model vode TIP3P. Parametri za kation Cu^{2+} reparametrizirani su kako bi reproducirali tetraedarsku koordinaciju, s obzirom da su prvotno bili razvijeni za oktaedarsku geometriju.[180] Reparametrizacija se temeljila na prethodno publiciranim parametrima za kation Cu^{2+} (ref. 180) koji su bili uspješni u opisivanju Jahn-Tellerovog efekta. Parametri za kofaktor TPQ kao i parametri za histamin generirani su *de novo*. Sustav je postepeno zagrijan od 0 K do 300 K u kratkom periodu od 25 ps, nakon čega je uslijedila ekvilibracija u periodu od 10 ns. Struktura dobivena nakon ekvilibracije je zatim korištena za generiranje 10 početnih struktura za EVB simulacije koje su se međusobno razlikovale u geometriji kako bi dobili 10 neovisnih profila za reakciju. Zatim su uslijedile FEP simulacije koje su se sastojale iz 51 koraka kojim se sustav postepeno prevodio iz reaktanata λ_0 u produkte λ_1. Trajanje svakog koraka je bilo 100 ps, što je rezultiralo 5,1 ns dugim simulacijama za svaku repliku. Krajnji rezultat je dan kao uprosječena vrijednost dobivena iz 10 replika simulacija (Tablica 11). Kako bi se izbjegla divergencija rezultata koja je povezana s ograničenom dužinom simuliranja, primijenjena je blaga pozicijska sila od 0,5 kcal $(\text{molÅ}^2)^{-1}$ na reaktivnim atomima, što je uobičajeni postupak.[181,182]

Profili EVB su dobiveni u *a posteriori* analizi podataka dobivenih iz FEP simulacija reakcije u odgovarajućoj sredini (plinska faza, vodena otopina, enzim DAO). U tu svrhu koristio se program qfep5 koji je dio programskog paketa Q v.5. EVB parametri koji su se koristili u

dobivanju profila za reakciju u vodi te za reakciju oksidacije HIS katalizirane enzimom DAO dobiveni su iz FEP simulacija reakcije koja je provedena u plinskoj fazi, a koja je usuglašena s vrijednostima $\Delta^{\ddagger}G^{o}_{\text{plin}}$ i $\Delta_{\text{r}}G^{o}_{\text{plin}}$ koje su prethodno dobivene kvantno-mehaničkim računima na razini teorije B3PW91/6-31G(d).

Tablica 11. Standardne Gibbsove energije aktivacije i reakcije za prijenos hidrida u reakciji oksidacije histamina dobivene u simulacijama EVB uprosječene preko 10 simulacijskih replika za svaku fazu.

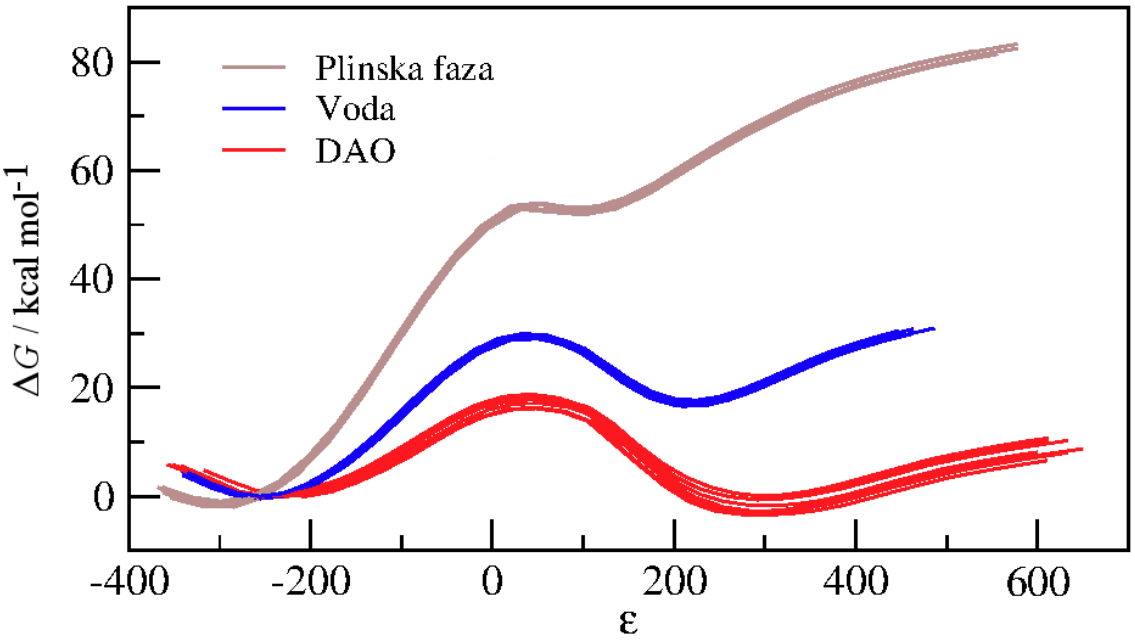
	$\boldsymbol{\Delta^{\ddagger}G^{o}}$ / kcal mol^{-1}	$\boldsymbol{\Delta_{r}G^{o}}$ / kcal mol^{-1}
plinska faza	54,8 ± 0,3	53,9 ± 0,2
voda	29,5 ± 0,2	17,2 ± 0,3
enzim DAO*	17,5 ± 1,1	-2,0 ± 1,5

* Eksperimentalna vrijednost za reakciju oksidacije histamina enzimom DAO je $\Delta^{\ddagger}G^{o}$=17,0 kcal mol^{-1}

Primjenjena metodologija EVB temelji se na glavnoj pretpostavci da je isti mehanizam za proučavanu reakciju operativan u plinskoj fazi, vodenoj otopini i proteinu. Stoga, nakon provedenih simulacija u plinskoj fazi, gdje je definirana referentna reakcija, reakcija koja se odvija po istom mehanizmu simulirana je u vodenoj otopini, a zatim i u enzimu koristeći uvijek iste EVB parametre. Ovo je validna aproksimacija s obzirom da je pokazano kako su EVB parametri neovisni o okolini u kojoj se provodi reakcija.[171]

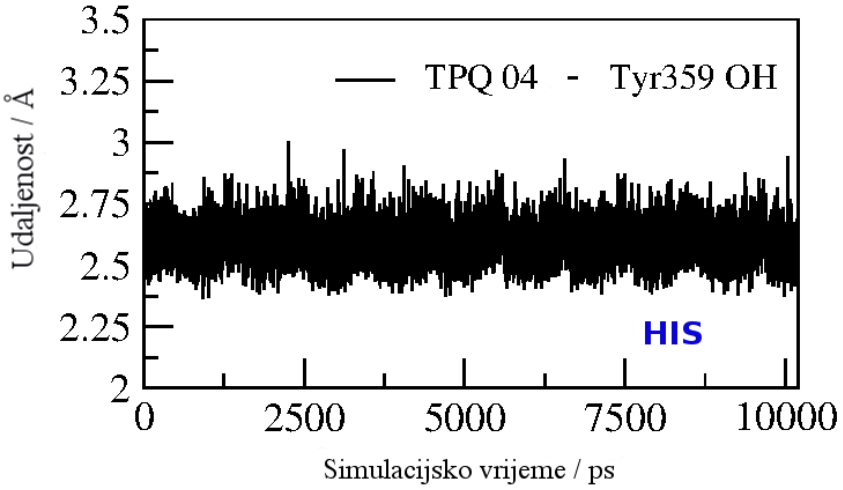
Rezultati prikazani u Tablici 11. te na Slici 42. pokazuju kako solvatacija ima pozitivan efekt na prijenos hidrida s histamina na kofaktor TPQ. Reakcija je zatim simulirana u enzimu te je primjećeno dodatno sniženje barijere do vrijednosti 17,5 kcal mol^{-1}, što je rezultiralo ubrzanjem od približno 9 redova veličine u odnosu na reakciju provedenu u vodi (Slika 42). Isto ubrzanje je izračunato za reakciju oksidacije dopamina[35] i *N*-metilhistamina (prikazano u ovoj disertaciji) enzimom MAO B koja se odvija po istom mehanizmu koji podrazumijeva prijenos hidrida u koraku koji određuje brzinu reakcije. Za razliku od reakcije oksidacije histamina kofaktorom TPQ, koja je provedena u plinskoj fazi i vodi, reakcija u enzimu je egzergona sa standardnom Gibbsovom energijom reakcije od -2 kcal mol^{-1} što pokazuje kako sljedeći korak u katalizi nije onemogućen prevelikom stabilizacijom produkta (međuprodukta). Izračunata standardna Gibbsova energija aktivacije od 17,5 kcal mol^{-1} je u odličnom slaganju s

eksperimentalnom vrijednosti za oksidaciju histamina enzimom DAO ($\Delta^{\ddagger}G^{o}$ = 17,0 kcal mol^{-1}) te sve skupa daje potvrdu o izvedivosti predloženog hidridnog mehanizma.



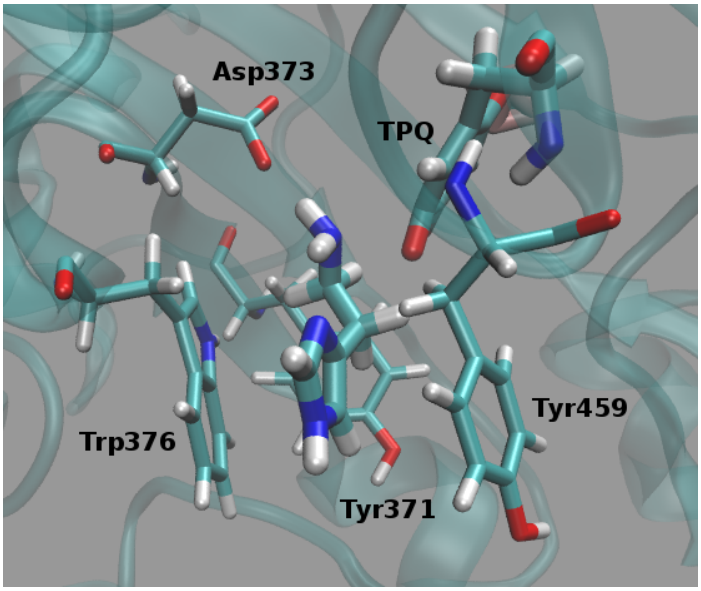
Slika 42. Profili EVB za reakciju oksidacije histamina koja je provedena u plinskoj fazi (smeđa), vodenoj otopinu (plava) te u enzimu DAO (crvena). ε je reakcijska koordinata definirana razlikom između potencijalnih ploha reaktanata i produkata.

Analiza EVB simulacija provedena je na 10 spojenih trajektorija (5,1 ns x 10 = 51 ns). Međutim, analizirana je svaka 5 struktura što je rezultiralo provedenom analizom na 10200 struktura. Analizom trajektorija uočeno je kako tijekom reakcije atom O4 kofaktora TPQ ostvaruje vodikovu vezu s hidroksilnom skupinom Tyr359 (Slika 43). Prosječna udaljenost između dva kisika O4(TPQ)-OH(Tyr359) tijekom simulacija iznosi 2,59 Å, što je u gotovo apsolutnom slaganju s kristalografskom vrijednosti između ova dva atoma. Važnost očuvane aminokiseline Tyr359 je u pravilnom pozicioniranju kofaktora TPQ vodikovom vezom.[42]



Slika 43. Prikaz udaljenosti O4(TPQ)-OH(Tyr359) tijekom reakcije prijenosa hidrida između histamina i kofaktora enzima DAO.

Reaktivna konformacija i orijentacija histamina osigurana je sljedećim aminokiselinama aktivnog mjesta enzima (Slika 44). Imidazolni prsten supstrata histamina postavljen je između bočnih ogranaka Trp376 i Tyr459, etilamino dio histamina orijentiran je prema prstenu Tyr371, dok amino skupina histamina ostvaruje vodikovu vezu s bočnim ogrankom Asp373. Sve navedene aminokiseline bile su dio modela enzima koji je korišten za mehanistička kvantno-mehanička istraživanja u sklopu klaster pristupa, što potvrđuje pravilni odabir te daje legimitet odabranom modelu enzima za proučavanje mehanizma reakcije. Bitno je spomenuti da je Tyr459 u eksperimentalnim istraživanjima već prepoznat kao usmjeravajuća (engl. *gating*) aminokiselina važna za pravilno smještanje supstrata.[67] Također, studije mutageneze, u kojima je aminokiselina Asp383 u enzimu DAO iz *E. coli* (aminokiselina koja odgovara Asp373 u humanom enzimu DAO), zamijenjena s 12 drugih aminokiselina, pokazale su kako je mutant DAO ili neaktivan ili mu je znatno smanjena katalitička efikasnost u usporedbi s enzimom divljeg tipa,[42] što je potvrdilo esencijalnu ulogu Asp383 u katalizi.



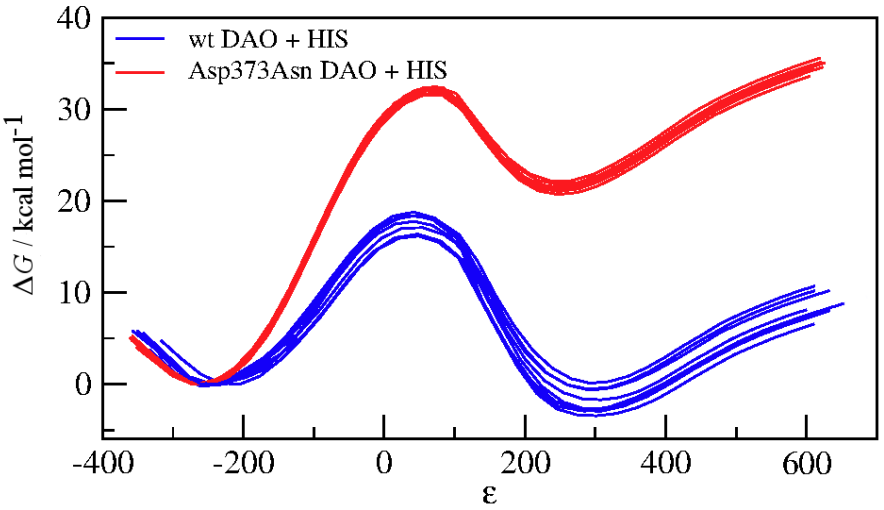
Slika 44. Prikaz histamina vezanog u aktivnom mjestu enzima DAO.

Kako bi se ispitala uloga aminokiseline aktivnog mjesta Asp373 u katalizi te kako bi se procijenio doprinos Asp373 katalitičkom efektu, Asp373 je zamijenjen u izostruktuni, ali kemijski različit Asn373. Pokazano je da nakon uvođenja ove mutacije enzim DAO gubi katalitičku aktivnost u usporedbi s enzimom divljeg tipa.[49] Na temelju toga je pretpostavljeno kako Asp373 ima ulogu baze koja uzima proton iz supstratnog Schiff-baza kompleksa, što je korak koji je nužan za nastajanje produkta Schiff-baza kompleksa u predloženom mehanizmu u literaturi koji podrazumijeva stvaranje Schiffove baze. Kako su sve promjene Asp373 u veliki broj drugih aminokiselina, s iznimkom mutacije u Glu, rezultirale gubitkom katalitičke aktivnosti enzima DAO, Asp je proglašen bazom koja je nužna za aktivnost enzima DAO. Time je indirektno potvrđeno kako katalitički mehanizam podrazumijeva stvaranje Schiffove baze između histamina i kofaktora TPQ. Međutim, tijekom izrade ove disertacije nije bilo moguće potvrditi stvaranje Schiffove baze te je predložen mehanizam koji uključuje prijenos hidrida gdje aminokiseline aktivnog mjesta enzima DAO ne sudjeluju direktno u reakciji. Stoga, nužno je bilo interpretirati eksperimentalne rezultate dobivene zamjenom Asp373 u enzimu primjenom EVB simulacija te opisati njegovu ulogu u katalizi. Dobivena standardna Gibbsova energija aktivacije za mutant Asp373Asn enzima DAO metodom EVB dana je u Tablici 12.

Tablica 12. Standardne Gibbsove energije aktivacije i reakcije oksidacije histamina katalizirane mutantnom Asp373Asn te enzimom DAO divljeg tipa.

	$\Delta^{\ddagger}G^{o}$ / kcal mol^{-1}	$\Delta_r G^{o}$ / kcal mol^{-1}
DAO divljeg tipa	17,5 ± 1,1	-2,0 ± 1,5
mutant Asp373Asn DAO	32,0 ± 0,3	21,3 ± 0,4

Iz Tablice 12 može se vidjeti kako standardna Gibbsova energija aktivacije za korak koji određuje brzinu reakcije oksidacije histamina koja je katalizirana mutantom enzima DAO iznosi 32,0 kcal mol^{-1}. Reakcija katalizirana ovim mutantom Asp373Asn DAO otprilike je deset redova veličine sporija u usporedbi s reakcijom kataliziranom enzimom divljeg tipa koja iznosi 17,5 kcal mol^{-1} (Slika 45). Štoviše, reakcija oksidacije histamina provedena mutantom Asp373Asn je veoma endergona (21,3 kcal mol^{-1}), što sve skupa objašnjava potpuni gubitak aktivnosti enzima DAO kada se Asp373 iz njegovog aktivnog mjesta zamjeni u bilo koju drugu aminokiselinu, s iznimkom zamjene u Glu, za što je izmjerena veoma mala, ali detektabilna aktivnost.[42] Stoga, uloga Asp373 je u osiguravanju pravilne orijentacije supstrata u odnosu na kofaktor TPQ te u osiguravanju adekvatnog elektrostatskog okruženja koje je esencijalno za katalizu.



Slika 45. Profili za reakciju oksidacije histamina koja je katalizirana mutantom Asp373Asn enzima DAO (crvena) te enzimom divljeg tipa (plavo) dobiveni iz EVB simulacija. ε je reakcijska koordinata definirana razlikom između potencijalnih ploha reaktanta i produkta.

§ 5. ZAKLJUČAK

Doktorski rad bavi se proučavanjem metabolizma histamina koji je uključen u mnoge važne procese poput upalnog odgovora, sekrecije želučane kiseline, neuromodulacije te regulacije imuniteta. Histamin se u tijelu sintetizira u enzimski kataliziranoj reakciji iz esencijalne aminokiseline histidin. Nakon što se sintetizira, histamin svoje biološko djelovanje iskazuje vezanjem za jedan od četiri membranska histaminska receptora, H_1, H_2, H_3 i H_4, koji strukturno pripadaju receptorima povezanim s G proteinima, u procesu koji se naziva aktiviranje receptora. Aktiviranjem histaminskih receptora prenosi se signal koji rezultira pokretanjem ili reguliranjem mnogih fizioloških procesa. Nakon što izvrši svoju ulogu, histamin se razgrađuje u jednom od dva metabolička puta. U jednom putu histamin se prvo enzimski metilira pri čemu nastaje produkt *N*-metilhistamin koji se zatim razgrađuje enzimom MAO B, dok se u drugom kataboličkom putu histamin direktno inaktivira enzimom DAO.

Glavni doprinosi ove doktorske disertacije podrazumijevaju proučavanje vezanja histamina za histaminski receptor H_2, odnosno identificiranje bitnih interakcija ostvarenih između histamina i aminokiselina veznog mjesta receptora, a koje su nužne za njegovo aktiviranje. U tu svrhu modeliran je histaminski receptor H_2, s obzirom na to da njegova struktura nije poznata. Zatim su identificirane bitne interakcije, a po prvi put je opisano kako je aminokiselina Tyr250 u veznom mjestu histaminskog receptora važna za pravilno vezanje histamina.[140] Ovi rezultati daju novi uvid u proces aktivacije receptora, ali i novu perspektivu u racionalnom dizajnu antagonista receptora H_2, koji predstavljaju lijekove za liječenje probavnih bolesti. U drugom dijelu doktorske disertacije proučen je mehanizam razgradnje histamina enzimima MAO B i DAO. U slučaju enzima MAO B prvo su opisane determinante njegove selektivnosti prema *N*-metilhistaminu (NMH) u odnosu na histamin (HIS), a zatim je potvrđen prethodno predložen hidridni mehanizam po kojem MAO B katalizira reakciju oksidativne deaminacije i drugih fizioloških supstrata poput dopamina. Zanimljivo je bilo pitanje kako se ostvaruje specifičnost enzima MAO B prema *N*-metilhistaminu u odnosu na histamin, budući da su to dva veoma slična supstrata koja se međusobno razlikuju u samo jednoj metilnoj skupini koja je pozicionirana u nereaktivnom dijelu molekule. Dobiveni rezultati su pokazali kako specifičnost na prvom mjestu potječe od niže energije aktivacije za NMH u odnosu na HIS, zatim je pokazano kako je NMH bolje pozicioniran u aktivnom mjestu enzima za reakciju u odnosu na HIS. NMH je manje fleksibilan zahvaljujući intramolekulskoj

vodikovoj vezi, a koja nije karakteristična za HIS, zbog čega je HIS fleksibilniji u aktivnom mjestu enzima, što za posljedicu ima dominantnu nereaktivnu konformaciju ovog spoja. Zatim, metilna skupina *N*-metilhistamina na imidazolnom prstenu omogućava ostvarivanje povoljnih hidrofobnih interakcija s bočnim ograncima Leu171, Leu328 i Ile199 aktivnog mjesta enzima, što za posljedicu ima bolje smještanje NMH u aktivnom mjestu enzima te njegovu pravilnu orijentaciju za reakciju. Svi doprinosi skupa definiraju selektivnost enzima MAO B prema *N*-metilhistaminu.[148]

Nakon toga proučen je katalitički mehanizam enzima DAO za razgradnju histamina. Rezultati su pokazali kako enzim DAO katalizira reakciju oksidativne deaminacije po istom mehanizmu kao i enzim MAO B, a koji podrazumijeva prijenos hidrida u koraku koji određuje brzinu reakcije. Aminokiseline Trp376, Tyr459, Tyr371 i Asp373 važne su za pravilno smještanje histamina u aktivnom mjestu enzima DAO. Posebno je značajna aminokiselina Asp373 s obzirom na to da tijekom reakcije ostvaruje vodikovu vezu s amino skupinom supstrata te ga pravilno pozicionira za reakciju. Istraživanja na enzimu DAO iz *E. coli* u kojima je Asp383 (koji odgovara Asp373 iz DAO čovjeka), pokazala su kako je mutant DAO u potpunosti izgubio aktivnost u usporedbi s enzimom divljeg tipa. Na temelju toga pretpostavljeno je kako Asp ima ulogu katalitičke baze te je indirektno potvrđen mehanizam koji uključuje stvaranje Schiffove baze. Međutim, EVB simulacije provedene na mutantu Asp373Asn enzima DAO pokazale su da je uloga Asp373 u osiguravanju pravilne orijentacije supstrata u odnosu na kofaktor TPQ te u osiguravanju adekvatnog elektrostatskog okruženja koje je esencijalno za katalzu.

Dobiveni rezultati pokazali su kako se degradacija histamina u tijelu odigrava uvijek po istom mehanizmu, neovisno o enzimu koji ga razgrađuje, tj. neovisno o kataboličkom putu, što je nova spoznaja u istraživanjima vezanih uz inaktivaciju histamina.

Doprinosi disertacije mogu se ukratko predstaviti:

- Modeliran je histaminski receptor H_2 s obzirom na to da njegova struktura nije poznata. Identificirane su interakcije između histamina i aminokiselina veznog mjesta receptora H_2 te je pokazano kako je aminokiselina Tyr250 u veznom mjestu histaminskog receptora važna za pravilno vezanje histamina.[140]
- Potvrđen je mehanizam koji podrazumijeva prijenos hidrida u reakciji oksidativne deaminacije *N*-metilhistamina enzimom MAO B. Selektivnost MAO B je utemeljena u sljedećim doprinosima. Izračunata je niža standardna Gibbsova energija aktivacije za NMH u odnosu na HIS, zatim je pokazano kako je NMH bolje orijentiran u aktivnom mjestu enzima za reakciju u odnosu na HIS, s obzirom na to da je manje fleksibilan zahvaljujući intramolekulskoj vodikovoj vezi te da njegova dodatna metilna skupina na imidazolnom prstenu omogućava bolje smještanje *N*-metilhistamina u aktivnom mjestu enzima što rezultira njegovom pravilnom orijentacijom za reakciju.[148]
- Pokazano je kako se reakcija oksidativne deaminacije histamina, koja je katalizirana enzimom DAO, odvija po hidridnom mehanizmu, a ne po mehanizmu koji uključuje stvaranje Schiffove baze, što je mehanizam opisan u literaturi. Simulacija reakcije degradacije histamina mutantom Asp373Asn enzima DAO pokazala je kako je Asp373 esencijalan za katalitički efekt enzima, međutim ne zbog toga što sudjeluje u stvaranju Schiffove baze, već zbog toga što osigurava povoljnu orijentaciju supstrata za reakciju te osigurava adekvatno elektrostatsko okruženje.
- Dobiveni rezultati skupa pokazuju kako se degradacija histamina u organizmu uvijek odigrava po istom mehanizmu, neovisno o enzimu koji ga razgrađuje, tj. neovisno o kataboličkom putu. Ovo je nova spoznaja u istraživanjima vezanih uz inaktivaciju histamina.

§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

Å	Ångström (10^{-10} m), mjerna jedinica za duljinu
AO	aminske oksidaze
CuAO	bakar-ovisne aminske oksidaze
DAAO	oksidaza D-aminokiselina
DAO	diamin-oksidaza
DFT	metoda funkcionala gustoće
EVB	metoda za simuliranje enzimskih reakcija (engl. *empirical valence bond*)
FAD	flavin-adenin-dinukleotid
FEP	perturbacija slobodne energije (engl. *free energy perturbation*)
GTO	Gaussianov tip orbitala (engl. *Gaussian-type orbitals*)
H2R	histaminski receptor H_2
HF	metoda Hartree-Fock
HIS	histamin
HMT	histamin-*N*-metiltransferaza
IRC	intrinsična reakcijska koordinata (engl. *intrinsic reaction coordinate*)
LDH	L-histidin-dekarboksilaza
MAO B	monoamin-oksidaza B
MD	molekulska dinamika
MEP	put najniže energije (engl. *minimum energy path*)
MM	molekulska mehanika
MM-PBSA	metoda za računanje slobodne energije vezanja
MP2	Moller-Plessetova metoda drugoga reda
NBO	metoda za analizu naboja (engl. *natural bond orbitals*)
NMH	*N*-metilhistamin
NMR	nuklearna magnetna rezonanca
PBC	periodični rubni uvjeti (engl. *periodic boundary conditions*)
PCM	metoda za oponašanje otapala (engl. *polarizable continuum model*)
PDB	proteinska baza podataka (engl. *protein data bank*)
PME	metoda za računanje elektrostatskih interakcija (engl. *particle mesh Ewald*)

QM	kvantna mehanika
QM/MM	kvantno-mehaničke/molekulsko-mehaničke metode
RMSD	usrednjeni korijen kvadrata odstupanja (engl. *root mean square deviation*)
SAM	*S*-adenozil-L-metionin
SASA	površina dostupna otapalu (engl. *solvent accessible surface area*)
SCF	samousklađeno polje (engl. *self-consistent field*)
STO	Slaterov tip orbitala (engl. *slater type orbitals*)
TPQ	2,4,5-trihidroksifenilalanin kinon
TS	prijelazna struktura (engl. *transition state*)
VMD	program za vizualizaciju i analizu (engl. *visual molecular dynamics*)

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. P. Panula, P. L. Chazot, M. Cowart, R. Gutzmer, R. Leurs, W. L. Liu, H. Stark, R. L. Thurmond, i H. L. Haas, *Pharmacol. Rev.* **67** (2015) 601–655.
2. G. N. Beall i J. P. P. Vanarsdel, *Calif. Med.* **95** (1961) 237–238.
3. A. W. Bach, N. C. Lan, D. L. Johnson, C. W. Abell, M. E. Bembenek, S. W. Kwan, P. H. Seeburg i J. C. Shih, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85** (1988) 4934-4938.
4. D. W. R. Hall, B. W. Logan i G. H. Parsons, *Biochem. Pharmacol.* **18** (1969) 1447-1454.
5. H. Y. Yang i N. H. Neff, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **187** (1973) 365-371.
6. C. J. Fowler i M. S. Benedetti, *J. Neurochem.* **40** (1983) 1534-1541.
7. C. Binda, J. Wang, M. Li, F. Hubalek, A. Mattevi i D. E. Edmondson, *Biochemistry* **47** (2008) 5616-5625.
8. C. Binda, M. Li, F. Hubalek, N. Restelli, D. E. Edmondson i A. Mattevi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100** (2003) 9750–9755.
9. F. Hubalek, C. Binda, A. Khalil, M. Li, A. Mattevi, N. Castagnoli i D. E. Edmondson, *J. Biol. Chem.* **280** (2005) 15761-15766.
10. K. Tanizawa, R. Matsuzaki, E. Shimizu, T. Yorifuji i T. Fukui, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199** (1994) 1096–1102.
11. Y. Yamada, O. Adachi i K. Ogata, *Agric. Biol. Chem.* **29** (1965) 117-123.
12. S. B. Baylin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74** (1977) 883-887.
13. J. P. Klinman i D. Mu, *Annu. Rev. Biochem.* **63** (1994) 299–344.
14. H. D. Dale i P. D. Laidlaw, *J. Physiol.* **41** (1910) 318–44.
15. M. Steinhoff, C. Griffiths, M. Church i T. A. Lugar, u T. Burns, S. Breathnach, N. Cox, i C. Griffiths (ur.), *Rook's textbook of dermatology*, Vol. 9, Blackwell Science, Oxford, 2004, str. 50–52.
16. T. Shimamura, M. Shiroishi, S. Weyand, H. Tsujimoto, G. Winter, V. Katritch, R. Abagyan, V. Cherezov, W. Liu, G. W. Han, T. Kobayashi, R. C. Stevens i S. Iwata, *Nature* **475** (2011) 65–70.
17. R. Vianello i J. Mavri, *New J. Chem.* **36** (2012) 954-962.
18. T. Bieganski, J. Kusche, K. D. Feussner, R. Hesterberg, H. Richter i W. Lorenz, *Agents Actions* **10** (1980) 108–110.
19. T. Bieganski, Z. Osinska i C. Masliński, *Agents Actions* **12** (1982) 41–46.

20. D. E. Edmondson, C. Binda, J. Wang, A. K. Upadhyay i A. Mattevi, *Biochemistry* **48** (2009) 4220-4230.

21. B. O. Elmore, J. A. Bollinger i D. M. Dooley, *J. Biol. Inorg. Chem.* **7** (2002) 565-579.

22. C. Binda, P. Newton-Vinson, F. Hubalek, D. E. Edmondson i A. Mattevi, *Nat. Struct. Biol.* **9** (2002) 22-26.

23. L. DeColibus, M. Li, C. Binda, A. Lustig, D. E. Edmondson i A. Mattevi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102** (2005) 12684–12689.

24. M. Li, C. Binda, A. Mattevi i D. E. Edmondson, *Biochemistry* **45**, (2006) 4775-4784.

25. J. P. Klinman i R. G. Matthews, *J. Am. Chem. Soc.* **107**, (1985) 1058-1060.

26. R. B. Silverman, *J. Biol. Chem.* **258** (1983) 14766–14769.

27. J. R. Miller i D. E. Edmondson, *Biochemistry* **38** (1999) 13670–13683.

28. J. Wang i D. E. Edmondson, *Biochemistry* **50** (2011) 7710–7717.

29. J. R. Miller i D. E. Edmondson, *J. Biol. Chem.* **274** (1999) 23515–23525.

30. J. M. Kim, A. M. Bogdan i S. P. Mariano, *J. Am. Chem. Soc.* **115** (1993) 10591–10595.

31. K. A. Kurtz, M. A. Rishavy, W. W. Cleland i P. F. Fitzpatrick, *J. Am. Chem. Soc.* **122** (2000) 12896–12897.

32. E. C. Ralph, M. A. Anderson, W. W. Cleland i P. F. Fitzpatrick *Biochemistry* **45** (2006) 15844–15852.

33. E. C. Ralph, J. S. Hirschi, M. A. Anderson, W. W. Cleland, D. A. Singleton i P. F. Fitzpatrick, *Biochemistry* **46** (2007) 7655–7664.

34. R. Vianello, M. Repič i J. Mavri, *Eur. J. Org. Chem.* **2012** (2012) 7057-7065.

35. M. Repič, R. Vianello, M. Purg, F. Duarte, P. Bauer, S. C. L. Kamerlin i J. Mavri, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **82** (2014) 3347-3355.

36. M. A. Akyüz i S. S. Erdem, *J. Neural. Transm.* **120** (2013) 937-945.

37. V. E. Atalay i S. S. Erdem, *Comput. Biol. Chem.* **47** (2013) 181-191.

38. G. Zapata-Torres, A. Fierro, G. Barriga-González, J. C. Salgado i C. Celis-Barros, *J. Chem. Inf. Model.* **55** (2015) 1349−1360.

39. B. Karasulu i W. Thiel, *ACS Catal.* **5** (2015) 1227-1239.

40. M. M. Kopacz, D. P. Heuts i M. W. Fraaije, *FEBS J.* **281** (2014) 4384-4393.

41. J. R. Tormos, M. B. Suarez i P. F. Fitzpatrick, *Arch. Biochem. Biophys.* **612** (2016) 115-119.

42. C. M. Wilmot, J. M. Murray, G. Alton, M. R. Parsons, M. A. Convery, V. Blakeley, A. S. Corner, M. M. Palcic, P. F. Knowles, M. J. McPherson i S. E. V. Phillips, *Biochemistry* **36** (1997) 1608-1620.

43. J. Samonina-Kosicka i M. Kańska, *Isotopes Environ. Health Stud.* **49** (2013) 357-364.

44. A. High, T. Prior, R. A. Bell i P. K. Rangachari, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **288** (1999) 490-501.

45. A. Mukherjee, V. V. Smirnov, M. P. Lanci, D. E. Brown, E. M. Shepard, D. M. Dooley i J. P. Roth, *J. Am. Chem. Soc.* **130** (2008) 9459-9473.

46. M. Mure i J. P. Klinman, *J. Am. Chem. Soc.* **117** (1995) 8697-8706.

47. M. Mure i J. P. Klinman, *J. Am. Chem. Soc.* **117** (1995) 8707-8718.

48. S. M. Janes i J. P. Klinman, *Biochemistry* **30** (1991) 4599-4605.

49. J. M. Murray, C. G. Saysell, C. M. Wilmot, W. S. Tambyrajah, J. Jaeger, P. F. Knowles, S. E. V. Phillips i M. J. McPherson, *Biochemistry* **38** (1999) 8217-8227.

50. M. Farnum, M. M. Palcic i J. P. Klinman, *Biochemistry* **25** (1986) 1898-1904.

51. M. Mure, S. A. Mills i J. P. Klinman, *Biochemistry* **41** (2002) 9269-9278.

52. K. M. O'Connell, D. B. Langley, E. M. Shepard, A. P. Duff, H.-B. Jeon, G. Sun, H. C. Freeman, J. M. Guss, L. M. Sayre i D. M. Dooley, *Biochemistry* **43** (2004) 10965-10978.

53. C. Binda, F. Hubálek, M. Li, D. E. Edmondson i A. Mattevi, *FEBS Lett.* **564** (2004) 225-228.

54. I. Rebrin, R. M. Geha, K. Chen i J. C. Shih, *J. Biol. Chem.* **276** (2001) 29499-29506.

55. C. Binda, A. Mattevi i D. E. Edmondson. *J. Biol. Chem.* **277** (2002) 23973-23976.

56. J. Gottowik, A. M. Cesura, P. Malherbe, L. Gabrielle i M. Da Prada, *FEBS Lett.* **317** (1993) 152–156.

57. H. F. Wu, K. Chen i J. C. Shih, *Mol. Pharmacol.* **43** (1993) 888-893.

58. R. Vianello i J. Mavri, u F. Duarte i S. C. L. Kmerlin (ur.), *Theory and Applications of the Empirical Valence Bond Approach: From Physical Chemistry to Chemical Biology*, Wiley, 2017, str. 199-223.

59. C. H. Best, *J. Physiol.* **67** (1929) 256–263.

60. H. Barth, I. Niemeyer i W. Lorenz, *Agents Actions* **3** (1973) 138-147.

61. L. Maintz i N. Novak, *Am. J. Clin. Nutr.* **85** (2007) 1185–1196.

62. T. Bieganski, J. Kusche, W. Lorenz, R. Hesterberg, C. D. Stahlknecht i K. D. Feussner, *Biochim. Biophys. Acta* **756** (1983) 196–203.

63. M. Raithel, M. Kufner, P. Ulrich i E. G. Hahn, *Inflamm. Res.* **48** (1999) 75-76.

64. J. Klocker, S. A. Matzler, G. N. Huetz, A. Drasche, C. Kolbitsch i H. G. Schwelberger, *Inflamm. Res.* **54** (2005) 54-57.

65. H. G. Schwelberger, A. Hittmair i S. D. Kohlwein, *Inflamm. Res.* **47** (1998) 60-61.

66. M. R. Parsons, M. A. Convery, C. M. Wilmot, K. D. Yadav, V. Blakeley, A. S. Corner, S. E. Phillips, M. J. McPherson i P. F. Knowles, *Structure* **3** (1995) 1171–1184.

67. A. P. McGrath, K. M. Hilmer, C. A. Collyer, D. M. Dooley i J. M. Guss, *Acta Crystallogr. Sect. F* **66** (2010) 137-142.

68. C. E. Ruggiero i D. M. Dooley, *Biochemistry* **38** (1999) 2892-2898.

69. C. E. Ruggiero, J. A. Smith, K. Tanizawa i D. M. Dooley, *Biochemistry* **36** (1997) 1953-1959.

70. S. Suzuki, T. Okajima, K. Tanizawa i M. Mure, u G. Floris i B. Mondovi (ur.), *Copper Amine Oxidases,* Taylor and Francis, Boca Raton, FL, 2009, str. 19-29.

71. Z. Chen, B. Schwartz, N. K. Williams, R. Li, J. P. Klinman i F. S. Mathews, *Biochemistry* **39** (2000) 9709–9717.

72. E. Jakobsson, J. Nilsson, D. Ogg i G. J. Kleywegt, *Acta Crystallogr. D* **61** (2005) 1550-1562.

73. R. R. Ramsay, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psych.* **69** (2016) 81–89.

74. R. R. Ramsay, *Curr. Top. Med. Chem.* **12** (2012) 2189-2209.

75. R. R. Ramsay, *Curr. Pharm. Des.* **19** (2013) 2529-2539.

76. S. Chajkowski-Scarry i J. M. Rimoldi, *Fut. Med. Chem.* **6** (2014) 697-717.

77. R. Notman i J. Anwar, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65** (2013) 237-250.

78. M. D. Morse i S. A. Rice, *J. Chem. Phys.* **76** (1982) 650-660.

79. J. E. Lennard-Jones, *Proc. Phys. Soc.* **43** (1931) 461-482.

80. P. Ewald, *Annalen der physik* **369** (1921) 253–287.

81. T. Darden, L. Perera, L. P. Li i L. Pedersen, *Structure* **7** (1999) 55-60.

82. K. Vanommeslaeghe, E. Hatcher, C. Acharya, S. Kundu, S. Zhong, J. Shim, E. Darian, O. Guvench, P. Lopes, I. Vorobyov i A. D. Mackerell Jr., *J. Comput. Chem.* **31** (2010) 671-690.

83. J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman i D. A. Case, *J. Comput.Chem.* **25** (2004) 1157-1174.

84. K. N. Kirschner, A. B. Yongye, S. M. Tschampel, J. González-Outeiriño, C. R. Daniels, B. L. Foley i R. J. Woods, *J. Comput. Chem.* **29** (2008) 622-655.

85. W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey i M. L. Klein, *J. Chem. Phys.* **79** (1983) 926-935.

86. H. J. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. Van Gunsteren i J. Hermans, *Nature* **224** (1969) 175-177.

87. J. P. Eckmann i D. Ruelle, *Rev. Mod. Phys.* **57** (1985) 617-656.

88. J. A. McCammon, B. R. Gelin i M. Karplus, *Nature* **267** (1977) 585-590.

89. J. R. Perilla, J. A. Hadden, B. C. Goh, C. G. Mayne i K. Schulten, *J. Phys. Chem. Lett.* **7** (2016) 1836-1844.

90. M. R. Mihailescu i I. M. Russu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98** (2001) 3773–3777.

91. A. Maršavelski, *RSC Adv.* **6** (2016) 44888-44895.

92. L. Verlet, *Phys. Rev.* **159** (1967) 98-103.

93. A. Hospital, J. R. Goñi, M. Orozco i J. L. Gelpí, *Adv. Appl. Bioinform. Chem.* **8** (2015) 37-47.

94. J. P. Ryckaert, G. Ciccotti i H. J. C. Berendsen, *J.Comput. Phys.* **23** (1977) 327-341.

95. B. R. I. Miller, T. D. J. McGee, J. M. Swails, N. Homeyer, H. Gohlke i A. E. Roitberg, *J. Chem. Theory Comput.* **8** (2012) 3314-3321.

96. D. A. Case, V. Babin, J. T. Berryman, R. M. Betz, Q. Cai, D. S. Cerutti, I. T. E. Cheatham, T. A. Darden, R. E. Duke, H. Gohlke, A. W. Goetz, S. Gusarov, N. Homeyer, P. Janowski, J. Kaus, I. Kolossváry, A. Kovalenko, T. S. Lee, S. LeGrand, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, K. M. Merz, F. Paesani, D. R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, R. Salomon-Ferrer, G. Seabra, C. L. Simmerling, W. Smith, J. Swails, R. C. Walker, J. Wang, R. M. Wolf, X. Wu i P. A. Kollman, AMBER 2014, **2014**.

97. http://biomol.bme.utexas.edu/wiki/index.php/ABS:MM/PBSA_with_amber:_theory_and_application (preuzeto 20. ožujka 2017. godine)

98. M. Born i R. Oppenheimer, *Annalen der physik* **389** (1927) 457–484.

99. C. Møller i M. S. Plesset, *Phys. Rev.* **46** (1934) 618–622.

100. P. Hohenberg i W. Kohn, Gas. *Phys. Rev.* **136** (1964) 864-871.

101. J. P. Perdew, K. Burke i M. Ernzerhof, *Phys. Rev. Lett.* **77** (1996) 3865-3868.

102. A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **98** (1993) 5648-5652.

103. E. Cancès i B. Mennucci, *J. Math. Chem.* **23** (1998) 309–326.

104. A. V. Marenich, C. J. Cramer i D. G. Truhlar, *J. Phys. Chem. B* **113** (2009) 6378-6396.

105. A. Klamt i G. Schüürmann, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **5** (1993) 799-805.

106. M. Cossi, N. Rega, G. Scalmani i V. Barone, *J. Comput. Chem.* **24** (2003) 669-681.

107. M. R. A. Blomberg, T. Borowski, F. Himo, R.-Z. Liao i P. E. M. Siegbahn, *Chem. Rev.* **114** (2014) 3601-3658.

108. A. Warshel i M. Levitt, *J. Mol. Biol.* **103** (1976) 227-249.

109. R. Lonsdale, J. N. Harvey i A. J. Mulholland, *Chem. Soc. Rev.* **41** (2012) 3025–3038.

110. H. J. Kulik, J. Zhang, J. P. Klinman i T. J. Martínez, *J. Phys. Chem. B* **120** (2016) 11381-11394.

111. G. Jindal i A. Warshel, *J. Phys. Chem. B* **120** (2016) 9913–9921.

112. K. H. Hopmann i F. Himo, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2008** (2008) 1406–1412.

113. K. H. Hopmann, J. D. Guo i F. Himo, *Inorg. Chem.* **46** (2007) 4850-4856.

114. R. Sevastik i F. Himo, *Bioorg. Chem.* **35** (2007) 444-457.

115. P. E. M. Siegbahn i T. Borowski, *Acc. Chem. Res.* **39** (2006) 729−738.

116. F. Himo, *Theor. Chem. Acc.* **116** (2006) 232−240.

117. P. E. M. Siegbahn i F. Himo, *Rev. Comput. Mol. Sci.* **1** (2011) 323-336.

118. S. C. L. Kamerlin, M. Haranczyk i A. Warshel, *J. Phys. Chem. B* **113** (2009) 1253-1272.

119. A. Warshel, *Acc. Chem. Res.* **35** (20002) 385-395.

120. A. Shurki, E. Derat, A. Barrozo i S. C. L. Kamerlin, *Chem. Soc. Rev.* **44** (2015) 1037-1052.

121. W. Humphrey, A. Dalke i K. Schulten, *J. Molec. Graphics* **14** (1996) 33-38.

122. 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.

123. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.

124. G. Schaftenaar i J. H. Noordik, *J. Comput.-Aided Mol. Design* **14** (2000) 123-134.

125. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, J. J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. G. R. Jaramillo, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. D. S. Dannenberg, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski i D. J. Fox, Gaussian 09, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.

126. J. Marelius, K. Kolmodin, I. Feierberg i J. Åqvist, *J. Mol. Graph. Model.* **16** (1998) 213-225.

127. J. Yang, R. Yan, A. Roy, D. Xu, J. Poisson i Y. Zhang, *Nat. Methods* **12** (2015) 7-8.

128. B. Webb i A. Sali. *Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. In: Curr Protoc Bioinformatics*, John Wiley and Sons, 2014, str. 5.6.1-5.6.32.

129. M. Biasini, S. Bienert, A. Waterhouse, K. Arnold, G. Studer, T. Schmidt, F. Kiefer, T. Gallo Cassarino, M. Bertoni, L. Bordoli i T. Schwede, *Nucleic Acids Res.* **42** (2014) 252–258.

130. L. A. Kelley, S. Mezulis, C. M. Yates, M. N. Wass i M. J. E. Sternberg, *Nature Protoc.* **10** (2015) 845–858.

131. C. Colovos i T. O. Yeates, *Protein Sci.* **2** (1993) 1511–1519.

132. I. Gantz, J. DelValle, L. D. Wang, T. Tashiro, G. Munzert, Y. J. Guo, Y. Konda i T. Yamada, *J. Biol. Chem.* **267** (1992) 20840–20843.

133. H. Preuss, P. Ghorai, A. Kraus, S. Dove, A. Buschauer i R. Seifert, *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **376** (2007) 253–264.

134. H. Weinstein, D. Chou, C. L. Johnson, S. Kang i J. P. Green, *Mol. Pharmacol.* **12** (1976) 738–745.

135. J. C. Eriks, H. van der Goot i H. Timmerman, *Mol. Pharmacol.* **44** (1993) 886–894.

136. P. H. Nederkoorn, J. H. van Lenthe, H. van der Goot, G. M. Donne-Op den Kelder i H. Timmerman, *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **10** (1996) 461–478.

137. P. H. Nederkoorn, E. M. van Gelder, G. M. Donne-Op den Kelder i H. Timmerman, *J. Comput. Aided. Mol. Des* **10** (1996) 479–489.

138. J. A. Maier, C. Martinez, K. Kasavajhala, L. Wickstrom, K. E. Hauser i C. Simmerling, *J. Chem. Theory Comput.* **11** (2015) 3696-3713.

139. M. H. M. Olsson, C. R. Søndergaard, M. Rostkowski i J. H. Jensen, *J. Chem. Theory Comput.* **7** (2011) 525–537.

140. M. Kržan, R. Vianello, A. Maršavelski, M. Repič, M. Zakšek, K. Kotnik, E. Fijan i J. Mavri *PLOS ONE*, (2016) 11(5):e0154002.

141. X. Sun, Y. Li, W. Li, Z. Xu i Y. Tang, *J. Mol. Graph. Model.* **29** (2011) 693-701.

142. G. K. Darland, R. Hajdu, H. Kropp, F. M. Kahan, R. W. Walker i W. J. A. Vandenheuvel, *Drug Metab. Dispos.* **14** (1986) 668-673.

143. L. P. McCarty, United States Patent No. US 4069346 A (January 1978).

144. 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.

145. T. Z. Jones, D. Balsa, M. Unzeta i R. R. Ramsay, *J. Neural. Transm.* **114** (2007) 707-712.

146. R. V. Dunn, K. R. Marshall, A. W. Munro i N. S. Scrutton, *FEBS J.* **275** (2008) 3850-3858.

147. R. Borštnar, M. Repič, S. C. L. Kamerlin, R. Vianello i J. Mavri, *J. Chem. Theory Comput.* **8** (2012) 3864–3870.

148. A. Maršavelski i R. Vianello, *Chem. Eur. J.* **23** (2017) 2915–2925.

149. M. Poberžnik, M. Purg, M. Repič, J. Mavri i R. Vianello, *J. Phys. Chem. B* **120** (2016) 11419-11427.

150. J. Stare, J. Mavri, J. Grdadolnik, J. Zidar, Z. B. Maksić iå R. Vianello, *J. Phys. Chem. B* **115** (2011) 5999-6010.

151. D. D. Perrin, B. Dempsey i E. P. Serjeant, *pKa Prediction for Organic Acids and Bases,* Chapman and Hall, London, 1981.

152. B. Mathew, A. A. Adeniyi, S. Dev, M. Joy, G. Ucar, G. E. Mathew, A. Singh-Pillay i M. E. S. Soliman, *J. Phys. Chem. B* **121** (2017) 1186–1203.

153. R. Vianello, C. Domene i J. Mavri, *Front. Neurosci* **10** (2016) 327.

154. A. K. Tan i R. R. Ramsay, *Biochemistry* **32** (1993) 2137–2143.

155. E. Abad, R. K. Zenn i J. Kästner, *J. Phys. Chem. B* **117** (2013) 14238-14246.

156. R. K. Zenn, E. Abad i J. Kästner, *J. Phys. Chem. B* **119** (2015) 3678–3686.

157. G. C. Patton, P. Stenmark, D. R. Gollapalli, R. Sevastik, P. Kursula, S. Flodin, H. Schuler, C. T. E. H. Swales, F. Himo, P. Nordlund i L. Hedstrom, *Nat. Chem. Biol.* **7** (2011) 950-958.

158. G. Jindal i A. Warshel, *J. Phys. Chem. B* **120** (2016) 9913–9921.

159. H. J. Kulik, J. Zhang, J. P. Klinman i T. J. Martínez, *J. Phys. Chem. B* **120** (2016) 11381-11394.

160. J. P. Foster i F. Weinhold, *J. Am. Chem. Soc.* **102** (1980) 7211–7218.

161. M. Pavlin, J. Mavri, M. Repič i R. Vianello, *J. Neural. Transm.* **120** (2013) 875-882.

162. R. Borštnar, M. Repič, M. Kržan, J. Mavri i R. Vianello, *Eur. J. Org. Chem.* **2011** (2011) 6419–6433.

163. M. Smith i J. March, *March's advanced organic chemistry: reactions, mechanisms and structure*, Wiley, New York, 2011.

164. C. Z. Ding, X. Lu, K. Nishimura i R. B. Silverman, *J. Med. Chem.* **36** (1993) 1711–1715.

165. d. C. J. T. Grotthuss, *Ann. Chim.* **58** (1806) 54–73.

166. P. Macheroux, S. Ghisla, C. Sanner, H. Ruterjans i F. Muller, *BMC Biochem.* **6** (2005) 26–36.

167. M. Husain, D. E. Edmondson i T. P. Singer, *Biochemistry* **21** (1982) 595-600.

168. A. Warshel i W. W. Parson, *Q. Rev. Biopys.* **4** (2001) 563-679.

169. A. Warshel, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **32** (2003) 425-443.

170. A. Warshel, P. K. Sharma, M. Kato, Y. Xiang, H. Liu i M. H. Olsson, *Chem. Rev.* **106** (2006) 3210-3235.

171. G. Hong, E. Rosta i A. Warshel, *J. Phys. Chem. B* **110** (2006) 19570-19574.

172. G. Oanca, M. Purg, J. Mavri, J. C. Shihdef i J. Stare, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18** (2016) 13346-13356.

173. W. L. Jorgensen i J. Tirado-Rives, *J. Am. Chem. Soc.* **110** (1988) 1657–1666.

174. J. Stare, *RSC Adv.* **7** (2017) 8740-8754.

175. A. P. McGrath, T. Caradoc-Davies, C. A. Collyer i J. M. Guss, *Biochemistry* **49** (2010) 8316-8324.

176. J. P. Klinman, *J. Biol. Chem.* **271** (1996) 27189-27192.

177. M. Mure i J. P. Klinman, *J. Am. Chem. Soc.* **115** (1993) 7117–7127.

178. H. Liu, J. E. Bara i C. H. Turner, *J. Phys. Chem. A* **118** (2014) 3944-3951.

179. X. Guo, H. Zipse i H. Mayr, *J. Am. Chem. Soc.* **136** (2014) 13863-13873.

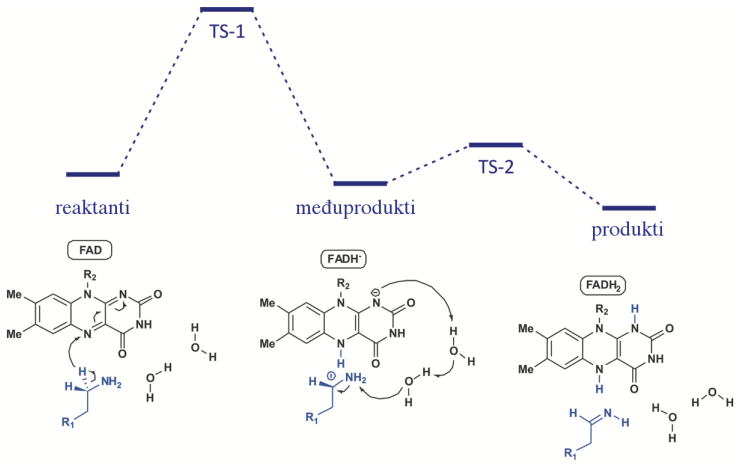
180. Q. Liao, S. C. L. Kamerlin i B. Strodel, *J. Phys. Chem. Lett.* **6** (2015) 2657–2662.

181. P. W. A. Schopf, *Proteins* **82** (2014) 1387–1399.

182. L. Mones, W. J. Tang i J. Florián, *Biochemistry* **52** (2013) 2672–2682.

§ 8. DODATAK

Tablica S1. Relativne Gibbsove energije dobivene tijekom degradacije histamina (**HIS**) i *N*–metilhistamina (**NMH**) enzimom MAO B u reakciji koja obuhvaća dva koraka. Korišteni su različiti funkcionali DFT na modelu enzima primjenom QM-klaster pristupa na razini teorije (CPCM)/**XXXX**/6–311++G(2df,2pd)//(CPCM)/M06–2X/6–31G(d) (**XXXX** označava odabrani funkcional DFT). Vrijednosti su dane relativno u odnosu na reaktante u kcal mol^{-1}. Rezultati dobiveni primjenom funkcionala PBE0 diskutirani su u glavnom tekstu dokorske disertacije.



supstrat / stacionarna točka	Funkcional DFT				$\Delta^{\ddagger}G^{0}_{(eksp.)}$ / kcal mol^{-1}
	M06–2X	BMK	B3LYP	PBE0	
***N*-metilhistamin (NMH)**					
reaktanti	0.0	0.0	0.0	0.0	
TS–1	28.3	25.3	21.1	20.4	17.8
međuprodukti	3.9	1.1	–1.0	–1.1	
TS–2	8.1	8.9	4.9	3.7	
produkti	–0.2	–3.8	–8.4	–4.2	
histamin (HIS)					
reaktanti	0.0	0.0	0.0	0.0	
TS–1	31.1	25.2	23.7	23.0	19.2
međuprodukti	7.1	9.8	9.1	5.9	
TS–2	10.4	15.9	12.2	8.7	
produkti	5.8	6.9	3.8	3.9	

Tablica S2. Relativne Gibbsove energije dobivene tijekom degradacije histamina (**HIS**) enzimom DAO u reakciji koja obuhvaća dva koraka. Korišteni su različiti funkcionali DFT na modelu enzima primjenom QM-klaster pristupa na razini teorije (CPCM)/**XXXX**/6–311++G(2df,2pd)-SDD//(CPCM)/M11L/6–31G(d)-SDD (**XXXX** označava odabrani funkcional DFT). Vrijednosti su dane relativno u odnosu na reaktante u kcal mol^{-1}. Rezultati dobiveni primjenom funkcionala M11L diskutirani su u glavnom tekstu doktorske disertacije.

supstrat / stacionarna točka	**Funkcional DFT**			$\Delta^{\ddagger}G^{0}_{(eksp.)}$ / **kcal** mol^{-1}
	M11L	**M06**	**PBE0**	
histamin (HIS)				
reaktanti	0.0	0.0	0.0	
TS–1	23.7	26.1	23.0	
međuprodukti	5.7	5.5	6.4	17.0
TS–2	7.4	8.0	6.1	
produkti	-2.5	0.0	1.3	
$TS\text{-}2_{alternativni}$	9.7	10.5	7.9	
$produkti_{alternativni}$	4.0	0.6	-9.0	

§ 9. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Aleksandra Maršavelski

Datum i mjesto rođenja: 25. 03. 1987. godine, Beograd

Email: aleksandra.marsavelski@gmail.com

Doktorand u Grupi za računalnu organsku kemiju i biokemiju, Zavod za organsku kemiju i biokemiju, Institut Ruđer Bošković, Zagreb

PRETHODNO RADNO ISKUSTVO

09/2013-09/2014 Stručno osposobljavanje za rad bez zasnivanja radnog odnosa, Laboratorij za kemijsku i biološku kristalografiju, Zavod za fizičku kemiju, Institut Ruđer Bošković, Zagreb

03/2012-09/2013 Volonter u Laboratoriju za kemijsku i biološku kristalografiju, Zavod za fizičku kemiju, Institut Ruđer Bošković, Zagreb

OBRAZOVANJE

09/2010-07/2011 Magistra biokemije, Kemijski fakultet Sveučilišta u Beogradu, Srbija

09/2006-07/2010 Diplomirani biokemičar, Kemijski fakultet Sveučilišta u Beogradu, Srbija

STIPENDIJE I NAGRADE

2017 Godišnja nagrada Društva sveučilišnih nastavnika i drugih znanstvenika u Zagrebu mladim znanstvenicima i umjetnicima

2016/2017 Stipendije Grada Zagreba doktorandima studija u gradu Zagrebu

2016 Godišnja nagrada Instituta Ruđer Bošković za izvrstan znanstveni rad

2016 FEBS Short-Term stipendija za znanstveno istraživački posjet labaratoriju prof. Lynn Kamerlin na Sveučilištu u Uppsali, Švedska

12/2011 Specijalno priznanje Srpskog Kemijskog društva za istaknuti uspjeh u studiju

09/2011 Student generacije na Kemijskom fakultetu Sveučilišta u Beogradu

11/2010 Nagrada za najbolji rad iz područja prirodnih znanosti; 3. Znanstveno-stručni skup studenata s međunarodnim sudjelovanjem „Students encountering science“, Banja Luka, Bosna i Hercegovina

10/2010 Stipendist Fonda za mlade talente Republike Srbije

10/2010 Najbolji student smjera Biokemija, Kemijski fakultet Sveučilišta u Beogradu

12/2007 Stipendija Zaklade Ljubica Zdravković

ZNANSTVENO USAVRŠAVANJE

01-02/2016 usavršavanje u području EVB simulacija enzimski kataliziranih reakcija, Laboratory of Computational Biochemistry and Drug Design, National Institute of Chemistry, Ljubljana, Slovenija

06-08/2016 usavršavanje u području EVB simulacija enzimski kataliziranih reakcija, Uppsala Biomedical Center, Department of Cell and Molecular Biology, Sveučilište u Uppsali, Uppsala, Švedska

KONFERENCIJE

The Third European Crystallography School, Bol, Brač, Hrvatska, 25/09–02/10/2016 (poster)

Advancing the Frontiers of (Bio)Chemistry with Valence Bond Approaches, Workshop, Sveučilište u Uppsali, Uppsala, Švedska, 23–25/06/2016 (poster i usmeno priopćenje)

Winter School "Computational Enzymology by Empirical Valence Bond", Kemijski institut, Ljubljana, Slovenija, 11-29/01/2016

The 29th European crystallographic meeting, Rovinj, Hrvatska, 23-28/08/2015 (poster)

International Summer School "Molecular Simulation for Neurological Targets", Kemijski institut, Ljubljana, Slovenija, 11–13/08/2015

"Symposium & Workshop on Microscale Thermophoresis", Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Hrvatska, 30/06-1/07/2015

“The binding of histamine and N-methylhistamine to monoamine oxidase B and their metabolic pathways” Computational Chemistry for Neurological Targets, Beograd, Srbija, 06-08/05/2015 (usmeno priopćenje)

“Computational investigations of the B. japonicum Gly:CP ligase 1 specificity towards amino acid substrate and aminoacyl carrier protein” AMBER Molecular dynamics workshop, Haifa, Izrael, 26-30/04/2015 (poster)

The 8th ISABS Conference in Forensic, Anthropology and Medical Genetics and Mayo Clinic Lectures in Translational Medicine, Split, Hrvatska, 24–28/06/2013

“Substrate selectivity of atypical methanogenic-type Seryl-tRNA synthetases-computational approach“. The 11th Greta Pifat-Mrzljak International School of Biophysics, Primošten, Hrvatska, 30/09–09/10/2012 (poster)

Regional Biocamp 2011, Ljubljana, Slovenija, 29-31/05/2011

FCUB-ERA Seminar: The structure of scientific articles, Beograd, Srbija, 11-14/04/2011

“Isolation and biochemical characterization of highly acidic protein fraction from human saliva“, 3rd scientific conference „Students encountering science“, Banja Luka, Bosna i Hercegovina, 24–26/11/2010 (usmeno priopćenje)

RAD U NASTAVI

2014 – Asistentica na kolegiju Praktikum biokemije na Zavodu za biokemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

ČLANSTVA U PROFESIONALNIM DRUŠTVIMA

Hrvatsko biofizičko društvo

Hrvatska kristalografska zajednica

Hrvatsko društvo za biokemiju i molekularnu biologiju

OBJAVLJENI ZNANSTVENI RADOVI

I. L. Ašler, Z. Štefanić, **A. Maršavelski**, R. Vianello, and B. Kojić-Prodić; "The Catalytic Dyad in the SGNH Hydrolase Superfamily: In-depth Insight into Structural Parameters Tuning Catalytic Process of Extracellular Lipase from Streptomyces rimosus", *ACS Chemical Biology* (2017), DOI: 10.1021/acschembio.6b01140

A. Maršavelski; R. Vianello; "What a difference a methyl group makes - the selectivity of monoamine oxidase B towards histamine and *N*-methylhistamine", *Chemistry - A European Journal* (2017), 24: 2915–2925.

R. J. Schwamm, R. Vianello, **A. Maršavelski**, M. Á. García, R. M. Claramunt, I. Alkorta, J. Saame, I. Leito, C. M. Fitchett, A. J. Edwards, and M. P. Coles; "15N NMR Spectroscopy, X-ray and Neutron Diffraction, Quantum-Chemical Calculations, and UV/vis-Spectrophotometric Titrations as Complementary Techniques for the Analysis of Pyridine-Supported Bicyclic Guanidine Superbases", *Journal of organic chemistry*, (2016), 81: 7612–7625.

A. Maršavelski; "A novel antimicrobial target—expanded and revisited mode of action of pantothenamides", *RSC advances*, (2016), 6: 44888-44895.

M. Kržan, R. Vianello, **A. Maršavelski**, M. Repič, M. Zakšek, K. Kotnik, E. Fijan and J. Mavri; "The Quantum Nature of Drug-Receptor Interactions: Deuteration Changes Binding Affinities for Histamine Receptor Ligands", *PLOS ONE*, (2016), 11(5):e0154002.

Đ. Škalamera, E. Sanders, R. Vianello, **A. Maršavelski**, A. Pevec, I. Turel and S. I. Kirin; "Synthesis and characterization of ML and ML2 metal complexes with amino acid substituted bis(2-picolyl)amine ligands", *Dalton transactions*, (2016), 45: 2845-2858.

A. Maršavelski, V. Smrečki, R. Vianello, M. Žinić, A. Moguš-Milanković and A. Šantić; "Supramolecular Ionic-Liquid Gels with High Ionic Conductivity", *Chemistry - A European Journal* (2015), 21: 12121–12128.

A. Maršavelski, M. Močibob, I. Gruić-Sovulj, R. Vianello; "The origin of specificity and insight into recognition between aminoacyl carrier protein and its partner ligase", *Physical Chemistry Chemical Physics* (2015), 17: 19030-19038.

A. Maršavelski, S. Lesjak, M. Močibob, I. Weygand-Đurašević, S. Tomić; "A single amino acid substitution affects the substrate specificity of the seryl-tRNA synthetase homologue", *Molecular BioSystems* (2014), 10: 3207-3216.

V. Prokopović, M. Popović, U. Anđelković, **A. Maršavelski**, B. Rasković, M. Gavrović-Jankulović, N. Polović; "Isolation, biochemical characterization and anti-bacterial activity of BPIFA2 protein", *Archives of Oral Biology* (2014), 59: 302-309.

M. Grabar Branilović, **A. Maršavelski**, A. Tomić, S. Tomić; "Nobelova nagrada za kemiju 2013", *Kemija u industriji* (2013), 62: 11-12.